

ISSN 0026-8984

Том 58, Номер 1

Январь - Февраль 2024



# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 1, 2024

## ОБЗОРЫ

- Фотохимические процессы повреждения клеточной ДНК УФ-излучением разных длин волн: биологические последствия  
*Г. Я. Фрайкин, Н. С. Беленикина, А. Б. Рубин* 3
- Методы прайм-редактирования геномов и программы дизайна гидовых РНК  
*Е. В. Михайлова, Б. Р. Кулуев, Г. А. Геращенко, Д. А. Чемерис, Р. Р. Гарафутдинов, А. Р. Кулуев, Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев, А. В. Чемерис* 22

## ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

- Длинные некодирующие РНК MEG3, TUG1 и hsa-miR-21-3p как потенциальные диагностические биомаркеры ишемической болезни сердца  
*М. Abdelgawad, Н. У. Abdallah, А. Fareed, А. Е. Ahmed* 40
- Целостность генома *Vacillus velezensis* после двухлетнего экспонирования в открытом космосе  
*С. В. Фиалкина, Е. А. Дешева, А. Л. Ракитин, О. И. Орлов* 43
- Структура и эволюция ДНК-транспозонов надсемейства *L31* двустворчатых моллюсков  
*М. В. Пузаков, Л. В. Пузакова* 54
- Кладспецифическая изменчивость белковых повторов у птиц  
*S. Sharma, L. Teekas, N. Vijay* 73
- Экспрессия гена *Fos* и некоторых связанных с ним генов в гипоталамусе гипертензивных крыс НИСАГ (ISIAN) при воздействии рестрикционного стресса  
*Ю. В. Маковка, Л. А. Федосеева, Д. Ю. Ощепков, А. Л. Маркель, О. Е. Редина* 78
- Группа новых гиперметилируемых генов длинных некодирующих РНК, ассоциированных с развитием и прогрессией рака молочной железы  
*Е. А. Филиппова, В. И. Логинов, С. С. Лукина, А. М. Бурдённый, И. В. Пронина, Т. П. Казубская, Э. А. Брага* 88
- Регуляция экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях *Drosophila melanogaster*  
*П. А. Миляева, И. В. Кукушкина, А. Р. Лавренов, И. В. Кузьмин, А. И. Ким, Л. Н. Нефедова* 99

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

- Повышенная экспрессия генов системы процессинга антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I в клетках рака молочной железы под действием трихостатина А  
*А. Н. Murtadha, N. A. Sharudin, I. I. M. Azahar, A. T. Che Has, N. F. Mokhtar* 121
- Взаимодействие SENP6 с PINK1 способствует резистентности клеток нейроглиомы к темозоломиду через индукцию митофагии  
*Y. W. Wang, K. G. Jia, H. J. Xing, Y. Pan, C. S. Zeng, L. Chen, Q. J. Su, W. T. Shen, J. Chen, C. Chen, Q. Cao, Y. Y. Wang* 126
- Взаимосвязь уровней мРНК генов *Cxcl12, Tweak, Notch1, Yap*, в молекулярных механизмах фиброгенеза печени  
*Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, Д. А. Зиновкин* 130
- Мелатонин усиливает действие АВТ-737 в клетках острого моноцитарного лейкоза ТНР-1  
*А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, Р. С. Фадеев, М. И. Кобякова, Я. В. Ломовская, Р. Р. Крестинин, Л. Д. Сотникова, О. В. Крестинина* 141

Низкая экспрессия вирусных микроРНК в макрофагах и незрелых В-клетках при латентной инфекции гигромициностойчивого гаммагерпесвируса-68 мыши <i>M. Kara</i>	154
Разработка высокоспецифичных и эффективных вариантов эндонуклеазы SpCas9 на основе hh-теории <i>G. H. Wang, C. M. Wang, X. J. Wu, T. Chu, D. W. Huang, J. Li</i>	157
Изучение стохастической упаковки белков Cas в экзосомы <i>Н. И. Пономарева, С. А. Брезгин, А. П. Костюшева, О. В. Слатинская, Е. О. Баярова, И. В. Гордейчук, Г. В. Максимов, Д. В. Соколова, Г. Бабаева, И. И. Хан, В. С. Покровский, А. С. Лукашев, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев</i>	160

## БИОИНФОРМАТИКА

Биоинформатический метод идентификации протеаз человека, активных относительно гликопротеинов оболочки вирусов, на примере белка шипа коронавируса SARS-CoV-2 <i>Е. В. Матвеев, Г. В. Пономарев, М. Д. Казанов</i>	171
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## ПРОТЕОМИКА

Протеом внеклеточных мембранных везикул <i>Bacillus pumilus</i> 3-19 <i>У. Курди, П. В. Зеленихин, Г. Ю. Яковлева, М. Н. Синягина, А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская</i>	178
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ДНК УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ РАЗНЫХ ДЛИН ВОЛН: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

© 2024 г. Г. Я. Фрайкин<sup>a, \*</sup>, Н. С. Беленикина<sup>a</sup>, А. Б. Рубин<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет

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

\*e-mail: GFraikin@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

УФ-излучение солнца индуцирует в ДНК клеток разных организмов фотохимические реакции, которые могут приводить к развитию ряда биологических ответов на возникающие повреждения, включая апоптоз, мутагенез и канцерогенез. Химическая природа и количество повреждений в ДНК зависят от длины волны УФ-излучения. УФ-излучение В-области (УФВ, 290–320 нм) вызывает образование двух главных дефектов – циклобутановых пиримидиновых димеров и с меньшим выходом пиримидин-(6-4)-пиримидиновых фотопродуктов; они формируются в результате прямого поглощения фотонов УФВ основаниями ДНК. УФ-излучение А-области (УФА, 320–400 нм), в отличие от УФВ, индуцирует с малым выходом формирование только циклобутановых димеров – наиболее вероятно путем триплет-триплетного переноса энергии от клеточных хромофоров к основаниям тимина ДНК. Вместе с тем УФА намного эффективнее по сравнению с УФВ в сенсibilизированном окислительном образовании дефектов в ДНК, таких как одноцепочечные разрывы и окисленные основания; из них наиболее часто встречается 8-оксодигидрогуанин, поскольку он может образовываться в нескольких окислительных процессах. За последнее время опубликовано много работ с новой, более детальной информацией о молекулярных механизмах фотохимических реакций, лежащих в основе формирования различных повреждений в ДНК. В настоящем обзоре обобщены и проанализированы в основном данные, содержащиеся в этих публикациях. Особое внимание уделено окислительным реакциям, которые инициируются активными формами кислорода и радикалами, генерируемыми потенциальными эндогенными фотосенсibilизаторами, такими как птерины, рибофлавин, протопорфирин IX, NADH и меланин. Обсуждается роль конкретных фотопродуктов ДНК в генотоксических процессах, индуцируемых в живых системах УФ-излучением разной длины волны, включая канцерогенез кожи человека.

**Ключевые слова:** УФ-излучение, фотохимия ДНК, реакции фотоокисления, клеточные сенсibilизаторы, повреждения ДНК, биологические последствия

**DOI:** 10.31857/S0026898424010019, **EDN:** OHVEXS

### ВВЕДЕНИЕ

УФ-диапазон электромагнитного излучения солнца принято подразделять на три области: УФС (200–280 нм), УФВ (290–320 нм) и УФА (320–400 нм), которая включает УФА1 (340–400 нм) и УФА2 (320–340 нм). Фотоны

УФС поглощаются кислородом и озоном стратосферы и в биосфере не присутствуют. УФВ фильтруется стратосферным озоном, поэтому только малая его часть (1.5%) проникает в биосферу. УФА, фотоны которого не поглощаются озоновым слоем, полностью достигает земной

Сокращения: УФВ/УФА – ультрафиолет В-области (290–320 нм)/ультрафиолет А-области (320–400 нм); CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) – циклобутановый пиримидиновый димер; (6-4)PP (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproduct) – (6-4)-фотопродукт; 8-oxodG (8-oxo-dihydroguanine) – 8-оксодигидрогуанин; Ptr (pterin) – птерин; For (6-formylpterin) – 6-формилптерин; Car (6-carboxypterin) – 6-карбоксиптерин; Nep (neopterin) – неоптерин; Bi-p (biopterin) – биоптерин; H<sub>2</sub>Bi-p (7,8-dihydrobiopterin) – 7,8-дигидробиоптерин; H<sub>4</sub>Bi-p (5,6,7,8-tetrahydrobiopterin) – 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин; ПКС – программированная клеточная смерть; АФК – активные формы кислорода; ТТЕТ (triplet-triplet energy transfer) – триплет-триплетный перенос энергии.

поверхности, и интенсивность этого излучения в 20 раз выше интенсивности излучения УФВ. Из двух видов “экологического” УФ-излучения солнца более сильное повреждающее действие на биологические системы оказывают высокоэнергетичные фотоны УФВ. Их значение с точки зрения риска индукции канцерогенеза в коже человека и клеточной смерти у растений возрастает в связи с повышением уровня излучения УФВ в биосфере вследствие расщепления стратосферного озона [1, 2]. ДНК – одна из критических молекулярных мишеней в клеточных структурах при облучении УФВ живых организмов. Фотоны УФВ в результате прямого поглощения основаниями ДНК эффективно индуцируют образование в ней нескольких типов фотопродуктов. В ответ на эти повреждения могут развиваться различные биологические ответы, такие как цитотоксичность, апоптоз и канцерогенез [3, 4]. Биологическая эффективность реакций повреждения клеточной ДНК при действии излучения УФА на 2–4 порядка ниже, чем при облучении УФВ. Однако поскольку в биосфере на долю длин волн области УФА приходится около 95% в УФ-спектре солнца, фотоны УФА тоже вносят вклад в гено- и цитотоксические эффекты – в основном с участием эндогенных фотосенсибилизаторов [5, 6].

К настоящему времени установлено, что оба компонента УФ-излучения солнца (УФВ и УФА) вовлекаются в развитие основных типов рака кожи человека. К ним относятся базально- и плоскоклеточный рак и меланома. Карциномы происходят из кератиноцитов, а меланома образуется из меланоцитов. Поскольку этиологический фактор (УФ-излучение) этих типов рака точно известен, они представляют собой перспективную систему для изучения разных этапов канцерогенеза. Особенно важно, что существует возможность охарактеризовать начальные процессы, происходящие в ДНК, и идентифицировать гены, которые часто и специфически подвергаются УФ-индуцированному мутагенезу.

В ранних исследованиях внимание ученых фокусировалось преимущественно на канцерогенном действии УФВ, поскольку было твердо установлено, что фотоны УФВ путем прямого возбуждения оснований ДНК эффективно индуцируют образование фотопродуктов, провоцирующих рак кожи. Была выявлена причинная связь между облучением УФВ и немеланомными типами рака кожи с характерными мутационными признаками – транзициями С→Т в дипиримидиновых сайтах ДНК [1]. Эти мутации вызваны главным образом циклобутановыми димерами пиримидинов (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD), которые репарируются в клетках медленнее, чем дефекты второго типа, возникающие в дипиримидиновых сайтах при облучении

УФВ, а именно пиримидин-(6-4)-пиримидоновые фотопродукты (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts, 6-4PP) [7, 8]. Быстрая репарация 6-4PP обусловлена тем, что они в большей степени, чем CPD, нарушают структуру двойной спирали ДНК, и поэтому легче узнаются ферментами эксцизионной репарации нуклеотидов и значительно эффективнее устраняются [9].

В последующие годы накопилось достаточно информации, свидетельствующей о том, что УФА играет более значительную роль в процессах канцерогенеза, чем считалось ранее [10, 11]. Также стало все более очевидным, что УФА1 не является фотохимически или биологически неактивным, прежде всего в связи с его активностью в фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода (АФК), которые, как полагают, играют роль в развитии рака кожи [12]. Излучение области УФА намного эффективнее УФВ в окислительном повреждении оснований ДНК в изолированных клетках и коже человека. Индуцированное УФА формирование 8-оксодигидрогуанина (8-oxo-dihydroguanine, 8-oxodG) обусловлено в основном селективным окислением гуанина синглетным кислородом ( $^1O_2$ ), генерируемым посредством механизма фотосенсибилизации типа II. Меньший вклад в этот процесс вносит гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), который может образовываться после начальной сенсбилизированной генерации супероксидного анион-радикала кислорода ( $O_2^{\cdot -}$ ) по механизму фотосенсибилизации типа I. Отмеченные фотосенсибилизированные реакции двух типов строго зависят от кислорода, и их можно классифицировать как “фотодинамические реакции”. Помимо 8-oxodG – главного фотопродукта окислительных реакций в ДНК – УФА вызывает образование окисленных пиримидинов и одноцепочечных разрывов, а также независимое от кислорода формирование CPD, содержащих преимущественно основания тимина [12, 13]. В соответствии с таким сложным спектром повреждений спектры мутаций, индуцированных УФА в клеточной ДНК, представлены транзициями G→A, обусловленными, по-видимому, CPD и трансверсиями G→T, вызванными, вероятно, 8-oxodG. Как отмечено выше, характерными для УФВ мутациями являются транзиции C→T [1]. Очевидно, что спектры повреждений и мутаций в ДНК зависят от длины волны фотонов УФ-излучения, вида клеток и эффективности действия их репарационных систем по устранению разных повреждений.

Цель данного обзора – обобщение и анализ основной информации о молекулярных механизмах формирования дефектов в ДНК при прямом поглощении фотонов УФ-излучения и посредством фотосенсибилизированных ре-

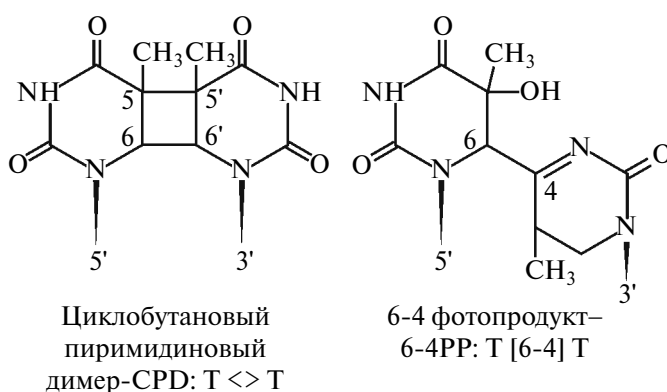
акций. Особое внимание уделяется процессам окислительного повреждения ДНК, которые инициируются АФК, генерируемыми эндогенными сенсбилизаторами, такими как протопорфирин IX, рибофлавин, птерины, NADH. Обсуждается конкретная природа фотопродуктов ДНК и их относительный вклад в генотоксические и цитотоксические эффекты, вызываемые в биологических системах УФВ и УФА.

**ФОТОХИМИЯ ДНК: ПРЯМЫЕ И ОПОСРЕДОВАННЫЕ СЕНСБИЛИЗАТОРАМИ ДЕСТРУКТИВНЫЕ РЕАКЦИИ**

*Механизмы формирования CPD и 6-4PP при действии УФ-излучения разной длины волн*

Основными хромофорами ДНК, поглощающими фотоны УФВ, как и “неэкологического” УФС, являются пиримидиновые и пуриновые основания, однако квантовые выходы фотохимических реакций пиримидиновых оснований на порядок выше, чем пуриновых. Поглощенные основаниями ДНК УФ-фотонов приводит к образованию их электронно-возбужденных синглетных и триплетных состояний, в которых они вступают в различные фотохимические реакции. Из них наибольший квантовый выход имеют реакции образования CPD и 6-4PP. Оба типа дефектов образуются соседними основаниями пиримидинов в одной цепи ДНК (рис. 1). В CPD циклобутановое кольцо формируется за 1 пс вследствие разрыва 5-6 двойных связей оснований. Формированию в 6-4PP одинарной связи предшествует стадия циклизации между связью C5–C6 пиримидина и карбонильной группы C4 тимина или иминогруппы цитозина, а далее образующиеся нестабильные продукты циклизации реорганизуются в 6-4PP. Сложный механизм данного процесса требует более длительного времени (4 мс) для его завершения. Кроме того, квантовый выход 6-4PP примерно в 7 раз меньше квантового выхода CPD. 6-4PP, в отличие от CPD, поглощает фотоны в области УФА и это вызывает переход 6-4PP при воздействии УФА в Dewar-изомер в быстрой (130 пс) реакции циклизации между N3 и C6 в структуре пиримидинового кольца 6-4PP [3].

В экспериментальных и теоретических исследованиях последних лет удалось изучить большинство фотофизических и фотохимических процессов, которые происходят после фотовозбуждения оснований тимина во всех Т-последовательностях. Они вовлекают дезактивацию возбужденных состояний, включая возникновение состояний с переносом заряда и экситона и последующее формирование отмеченных выше дефектов ДНК [14, 15]. Об-



**Рис. 1.** УФ-индуцированные бипиримидиновые повреждения в ДНК на примере оснований тимина, расположенных в одной цепи ДНК. Фотоны УФВ вызывают формирование обоих типов дефектов, а фотоны УФА – только CPD (T<>T) с малым выходом.

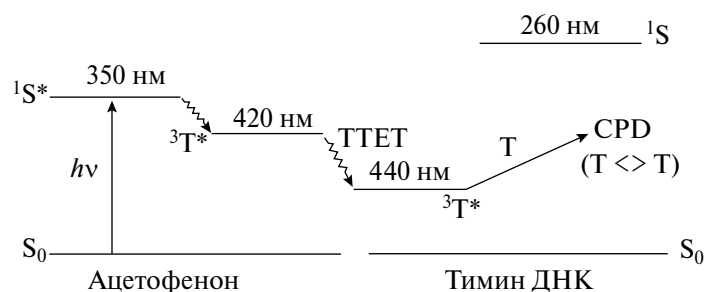
наружено, в частности, что при прямом возбуждении фотонами УФС оснований тимина в ТТ-последовательностях формирование CPD происходит преимущественно через синглетное возбужденное состояние за 1 пс [16]. Заселение триплетного уровня посредством интеркомбинационной конверсии тоже может приводить к выходу CPD, но он ограничен выходом триплетного состояния, составляющим 0.01, и сравнительно малым квантовым выходом димеризации с этого состояния. В Т-олигомере (dT)<sub>18</sub> триплет тимина распадается за 10 нс, вероятно, через бирадикал со временем жизни 60 нс, который рассматривается как интермедиат в формировании CPD через триплетный канал [17, 18].

По сравнению с процессами УФ-индуцированного формирования дефектов ДНК в ТТ-последовательностях, фотофизика и фотохимия которых хорошо изучены, о механизмах процессов формирования намного более мутагенных повреждений в дипиримидиновых сайтах, содержащих цитозин, до недавнего времени известно было мало. Как и в ТТ-последовательностях, дефекты в последовательностях ТС и СТ могут формироваться либо путем прямого поглощения фотонов УФС/УФВ, либо вследствие процессов, происходящих после поглощения фотонов УФА другими хромофорами [14]. Если такие хромофоры находятся в непосредственной близости к генетическому материалу, они могут индуцировать триплетные состояния в ДНК через триплет-триплетный перенос энергии (triplet–triplet energy transfer, TTET) с последующим образованием CPD, но не 6-4PP [3, 19]. На основании данных о распределении CPD в молекулах ДНК с различными композициями оснований предположили, что механизм TTET не может объясняться возбуждением только от-

дельных Т-оснований, он вовлекает динуклеотиды как минимальные мишени в этой фотосенсибилизированной реакции [19]. Возможная роль делокализации электронно-возбужденного состояния минимум по двум динуклеотидам показана и при прямом поглощении фотонов УФ-излучения основаниями ДНК [20, 21].

Известно, что формирование фотосенсибилизированных повреждений в ДНК инициируется реакциями при Т-основаниях, так как у Т-основания энергетически самый низкий триплетный уровень ( $270 \text{ кДж моль}^{-1}$ ), поэтому

любое химическое соединение с более высокой энергией триплетного состояния можно рассматривать как потенциальный триплетный сенсибилизатор. В качестве фотосенсибилизаторов могут действовать различные соединения, включая ароматические кетоны, например ацетофенон и бензофенон, у которого квантовый выход в триплет близок к единице, а энергия триплетного уровня составляет  $290 \text{ кДж моль}^{-1}$  [22]. Модель фотосенсибилизированной ацетофеноном димеризации Т-оснований в ДНК иллюстрирует схема, приведенная на рис. 2.



**Рис. 2.** Модель фотосенсибилизированного ацетофеноном формирования в ДНК CPD ( $T \leftrightarrow T$ ). Значения уровней энергии на схеме приведены в длинах волн квантов соответствующей энергии. При поглощении фотона УФА с длиной волны 350 нм ( $h\nu$ ) ацетофенон переходит в синглетное возбужденное состояние ( $^1S^*$ ), а затем путем интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ( $^3T^*$ ). В процессе фотосенсибилизации происходит триплет-триплетный перенос энергии (triplet-triplet energy transfer, TTET) на триплетный уровень тимина (Т), который в возбужденном состоянии ( $^3T^*$ ) взаимодействует с соседним Т-основанием, формируя CPD ( $T \leftrightarrow T$ ).

Помимо внешних сенсибилизаторов, недавно выявлены хромофоры внутри самой молекулы ДНК, обладающие фотосенсибилизирующими свойствами, в том числе 5-формилурацил — основной продукт окислительного повреждения тимина [23, 24]. Его фотосенсибилизирующая активность установлена в экспериментах по облучению УФА сверхспиральной ДНК, а возможность интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние и переноса энергии на тимин подтверждена в недавнем теоретическом исследовании [25]. На основании данных модельных экспериментов предполагалось, что в качестве внутреннего фотосенсибилизатора может действовать и пиримидиновая субъединица фотопродукта 6-4РР, которая после фотовозбуждения в триплетное состояние передает энергию на триплетный уровень соседнего тимина с последующим формированием CPD [26]. Однако выяснение роли этой фотосенсибилизированной реакции в дцДНК показало, что опосредованный 6-4РР триплет-триплетный перенос энергии вносит очень малый вклад в индуцированное УФА повреждение ДНК [27]. Это объясняется весьма эффективной фотоизомеризацией 6-4РР в Dewag-изомер — главной индуцированной УФА реакцией после образования в ДНК 6-4РР под действием УФВ [3].

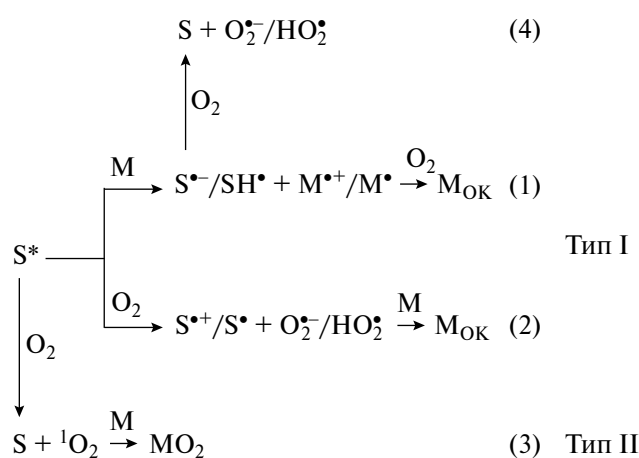
Процессы эффективного переноса энергии, запускаемые хромофорами либо вне, либо внутри ДНК, приводят к преимущественному заселению возбужденных состояний Т-оснований. Это лежит в основе повреждений ДНК, возникающих в сайтах TrT, CpT и TrC. Из них особенно мутагенны дефекты, формируемые в C-содержащих сайтах, что обусловлено реакциями гидролитического дезаминирования, которые превращают C-образуемую часть повреждения (CPD) в CPD, содержащий урацил (U). Впоследствии U-содержащие дефекты реплицируются в TrT-сайты, и такая C→T-конверсия является главной причиной высокой мутагенности УФ-излучения [28].

С применением ИК-спектроскопии временного разрешения проведено детальное изучение триплетного пути фотосенсибилизированного 2'-метоксиацетофеноном формирования CPD в последовательностях CpT и TrC. Показано, что триплетное состояние сначала образуется у Т-основания, но оно распадается за 30 нс вследствие перехода в бирадикальное состояние, которое распространяется на оба основания дипиримидинов и в котором одна связь циклобутанового кольца уже сформирована. Далее это состояние либо возвращается в основное

электронное состояние за 100 нс, либо из него формируется CPD [28]. Недавно выявлен новый путь формирования CPD в ДНК, содержащей 5-метилцитозин. Как установлено, стабилизация триплетного бирадикального интермедиата 5-метилцитозина посредством его метильной группы повышает выход CPD [29].

*Фотосенсибилизированные реакции окислительного повреждения ДНК*

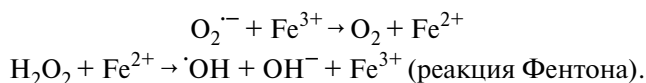
Эти реакции, в отличие от рассмотренных выше фотосенсибилизированных реакций, строго зависят от кислорода. В фотосенсибилизированном окислении молекул биосубстрата кислород может реагировать с электронно-возбужденным сенсибилизатором или участвовать на вторичных стадиях в реакциях с радикалами, возникающими от фотосенсибилизатора либо субстрата (рис. 3). По механизму первичного процесса реакции фотосенсибилизированного окисления разделяют на два типа – I и II [30].



**Рис. 3.** Начальные стадии сенсибилизированных окислительных реакций типа I и типа II в молекулах биосубстрата (M). S\* – фотовозбужденный сенсибилизатор; Mок – продукт окисления молекулы.

**Общая характеристика фотосенсибилизированных окислительных реакций типа I и типа II.** Механизм типа I инициируется реакцией переноса электрона между фотовозбужденным сенсибилизатором (S\*) и молекулой биосубстрата (M), в результате чего образуется пара радикалов: анион-радикал S<sup>•-</sup> или его протонированная форма SH<sup>•</sup> и катион-радикал M<sup>•+</sup> или его депротонированная форма M<sup>•</sup> (рис. 3, реакция 1). В альтернативной первичной бимолекулярной реакции, которая может инициировать механизм типа I, фотовозбужденный сенсибилизатор восстанавливает O<sub>2</sub>, что приводит

к формированию катион-радикала S<sup>•+</sup> или его депротонированной формы S<sup>•</sup> и супероксидного анион-радикала O<sub>2</sub><sup>•-</sup> и его протонированной формы HO<sub>2</sub><sup>•</sup> (рис. 3, реакция 2). Супероксидный анион-радикал – это ион молекулы кислорода с одним неспаренным электроном. После первичного одноэлектронного окисления молекулы биосубстрата (рис. 3, реакция 1) оба формируемых радикала участвуют в нескольких последующих реакциях. Так, анион-радикал фотосенсибилизатора реагирует с O<sub>2</sub>, вследствие чего происходит регенерация сенсибилизатора и образуется O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (рис. 3, реакция 4). Считается, что этот процесс является главным источником O<sub>2</sub><sup>•-</sup> в фотосенсибилизированных реакциях, и он намного более значим, чем прямое восстановление O<sub>2</sub> возбужденным сенсибилизатором (рис. 3, реакция 2). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> находится в равновесии (pK<sub>a</sub> = 3.6) со своей протонированной формой HO<sub>2</sub><sup>•</sup> и может подвергаться спонтанной или ферментативной дисмутации в пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – еще одну АФК, обладающую малой реакционной способностью. Как и O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не проявляет значительной реакционной активности в отношении большинства биомолекул [31]. Однако H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может мигрировать по всей клетке и вызывать в присутствии Fe<sup>2+</sup> протекание реакции Фентона – одной из двух реакций Хабера–Вайса:



Высокореакционноспособный ·ОН-радикал, образующийся в ходе этой реакции, способен реагировать в месте генерации с биомолекулами посредством присоединения к двойным связям и/или отрыва атома водорода. Обе реакции приводят к образованию нейтральных радикалов молекул (M<sup>•</sup>) – вероятных предшественников пероксильных радикалов (MOO<sup>•</sup>), возникающих при взаимодействии M<sup>•</sup> с O<sub>2</sub>. Процесс завершается окислительным повреждением молекул. Катион-радикал молекулы субстрата (M<sup>•+</sup>), который формируется в реакции 1 (рис. 3), после депротонирования может подвергаться гидратации с образованием M<sup>•</sup>-ОН. В дальнейшей реакции этой формы с O<sub>2</sub> путем присоединения либо одноэлектронного окисления образуются окисленные и/или оксигенированные продукты (Mок)[32].

В отличие от радикального механизма реакций типа I первичный механизм реакций типа II вовлекает перенос энергии от возбужденного в триплетное состояние сенсибилизатора к растворенному кислороду, который находится в основном триплетном состоянии (O<sub>2</sub>) (рис. 3, реак-

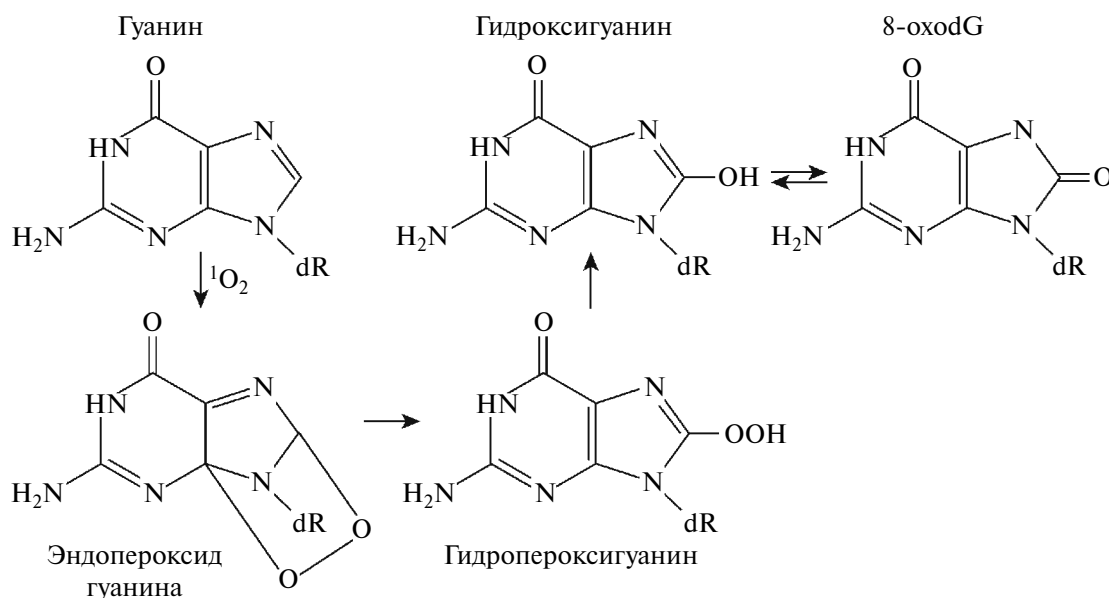


ция 3). Это приводит к образованию синглетного молекулярного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) в результате обращения спина одного из двух неспаренных электронов у  $\text{O}_2$ . Разница энергий между основным (триплетным) и синглетным состояниями кислорода составляет  $94.2 \text{ кДж моль}^{-1}$  и соответствует переходу в инфракрасной области (около 1270 нм). Перенос энергии от триплетного сенсбилизатора на кислород с переводом его в синглетное возбужденное состояние показан прямым методом измерения фотосенсибилизированной люминесценции  $^1\text{O}_2$  при 1270 нм [33]. Молекулярный кислород в активированном (синглетном) состоянии намного реакционноспособнее, чем в основном состоянии. Вместе с тем  $^1\text{O}_2$  — более селективный окислитель по сравнению с  $\cdot\text{OH}$ ; он также имеет существенно меньшее время жизни, а его переход в основное состояние является физическим процессом.

#### Формирование окисленных G-оснований ДНК в реакциях типа I и типа II.

Окисление гуанина синглетным кислородом по механизму типа II.  $^1\text{O}_2$ , как электрофил, мо-

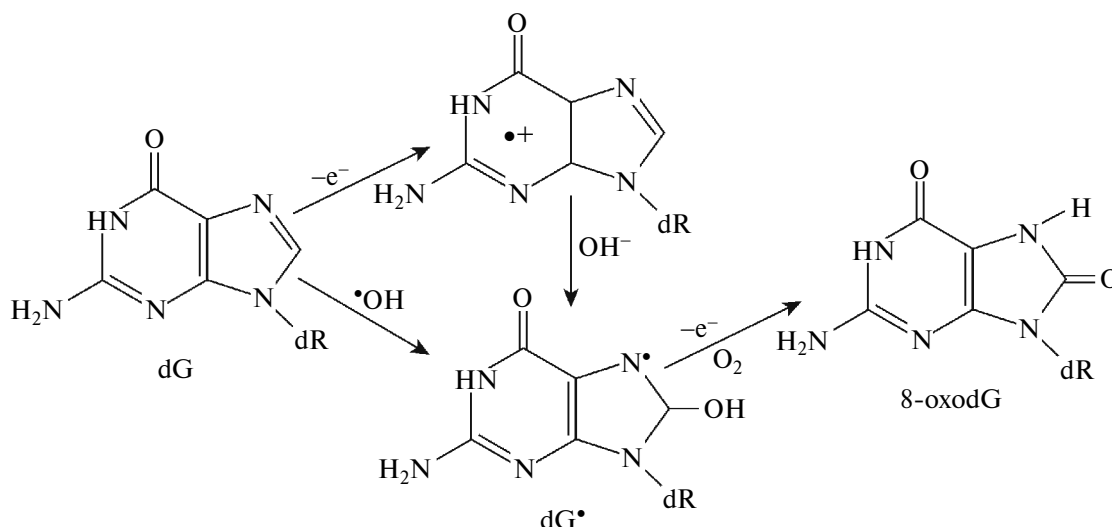
жет реагировать со многими богатыми электронами биомолекулами, включая ДНК, но из всех пиримидиновых и пуриновых оснований ДНК только гуанин восприимчив к  $^1\text{O}_2$  в водных растворах [34]. Эта селективная реакционная активность  $^1\text{O}_2$ , предложенная на основе данных о наивысшей скорости его химического тушения у гуанина, получила дальнейшее подтверждение в теоретических исследованиях [35]. Во многих работах с использованием различных фотосенсибилизаторов показано, что конечным продуктом окисления гуанина синглетным кислородом является 8-oxodG. Процесс, инициирующий его формирование, состоит в присоединении  $^1\text{O}_2$  к имидазольному кольцу посредством реакции циклизации “[2 + 4] Diels-Alder”, сопровождаемой образованием 4,8-эндопероксида гуанина (рис. 4). Формирование исключительно 8-oxodG в ДНК объясняется реорганизацией эндопероксида преимущественно в 8-гидропероксигуанин с последующей конверсией этого нестабильного интермедиата в 8-гидроксигуанин, который находится в динамическом равновесии с 8-oxodG — более стабильным таутомером в растворе [36].



**Рис. 4.** Реакция окисления синглетным кислородом гуанина в ДНК. Первый продукт реакции, формируемый присоединением  $^1\text{O}_2$  к имидазольному кольцу гуанина (эндопероксид), подвергается реорганизации с образованием гидропероксигуанина, который восстанавливается в гидроксигуанин, находящийся в динамическом равновесии с наиболее стабильным конечным продуктом окисления 8-oxodG.

Реакции окислительной деградации гуанина, опосредованные  $\cdot\text{OH}$  и одноэлектронным окислением по механизму типа I. В соответствии с реакцией 1 (рис. 3) фотосенсибилизированное одноэлектронное окисление гуанина вызывает на первой стадии образование катион-радикала  $\text{dG}^{\cdot+}$  (рис. 5). В последующей реакции гидрата-

ции  $\text{dG}^{\cdot+}$  формируется радикал 8-гидроксицидигуанил, который далее может превращаться в 8-oxodG путем  $\text{O}_2$ -опосредованного одноэлектронного окисления [37, 38]. Радикал 8-гидроксицидигуанил может быть индуцирован и  $\cdot\text{OH}$  посредством присоединения к С8 гуанина, а дальнейшее превращение этого радикала



**Рис. 5.** Реакции фотосенсибилизированного окисления гуанина (dG) в ДНК по механизму типа I. Показаны два пути образования нейтрального гидроксигуанил-радикала (dG<sup>·</sup>) — предшественника конечного продукта окисления гуанина. dG<sup>·</sup> может формироваться как в результате гидратации катион-радикала dG, который образуется при одноэлектронном окислении dG, так и вследствие присоединения ·OH к C8 dG. Последующее O<sub>2</sub>-зависимое одноэлектронное окисление dG<sup>·</sup> приводит к формированию 8-oxodG.

в 8-oxodG происходит с участием O<sub>2</sub> путем одноэлектронного окисления (рис. 5). Как показано выше, ·OH образуется в реакции Фентона из H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — продукта дисмутации O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, который формируется при взаимодействии анион-радикала S<sup>·-</sup> с O<sub>2</sub> (рис. 3, реакция 4).

### УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ДНК: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Биологические последствия фотохимических деструктивных реакций в клеточной ДНК изучают, воздействуя УФ-излучением на микроорганизмы, растения, а также культивируемые клетки и кожу человека *in vivo*. В этих работах твердо установлено, что УФ-фотоны повреждают клеточную ДНК, вызывают мутации и фотоокислительный стресс [3, 4, 13, 39]. Хотя общепринято, что УФ-повреждения в ДНК индуцируют цитотоксические эффекты, апоптоз и канцерогенез кожи, вопрос о конкретном типе фотопродуктов ДНК, которые могут быть критичными в развитии каждого из отмеченных биологических ответов, еще далек от окончательного решения. Одна из основных причин этого состоит в том, что распределение и квантовый выход конкретного дефекта в ДНК во многом зависят от длины волны УФ-света, природы эндогенных фотосенсибилизаторов, а также от активности систем репарации ДНК и антиоксидантов, присутствующих в различных типах клеток [13, 39].

Индуцированные УФ-излучением фотохимические реакции в ДНК клеток разных организмов могут быть результатом как прямых взаимодействий УФ-фотонов с основаниями нуклеотидов, так и фотосенсибилизированных процессов, запускаемых эндогенными хромофорами. Молекулярные механизмы действия УФВ и УФА на клеточную ДНК существенно различаются. Фотоны УФВ вызывают прямое возбуждение оснований ДНК и индуцируют независимое от кислорода образование двух главных типов фотопродуктов — CPD и 6-4PP. В ДНК клеток, облученных УФА, выявлены только CPD, причем в основном Т-содержащие [7]. УФА намного эффективнее, чем УФВ, формирует в клеточной ДНК окислительные повреждения оснований и 2-дезоксирибозы [40]. Индуцированное УФА образование 8-oxodG обусловлено главным образом селективным окислением G-основания синглетным кислородом. Помимо этого, гидроксильный радикал (·OH) вносит дополнительный вклад в деградацию ДНК вследствие формирования окисленных оснований и одноцепочечных разрывов [41]. Рассматриваемые ниже фотоокислительные реакции повреждения клеточной ДНК в большинстве случаев опосредуются эндогенными сенсибилизаторами — потенциальными источниками АФК. Вопрос о молекулярных основах этих процессов обсуждается с привлечением данных детальных модельных исследований, согласно которым в этих процессах может участвовать синглетный кислород, гидроксильный радикал и реакции одноэлектронного окисления [35, 42–44].

*Окислительное повреждение клеточной ДНК  
при облучении УФВ*

Помимо главных фотопродуктов (CPD и 6-4PP), формирование которых от кислорода не зависит, УФВ может с малой эффективностью индуцировать реакции окислительной дегградации клеточной ДНК. Показано, что при воздействии УФВ в дозе 1 кДж/м<sup>2</sup> на 10<sup>6</sup> оснований в ДНК формируется 150 CPD, а O<sub>2</sub>-зависимых одноцепочечных разрывов, окисленных пиримидиновых оснований и модифицированных пуринов – 0.37, 0.36 и 0.62 соответственно [45]. Эти данные служат подтверждением того, что молекулярные основы действия УФВ на клеточную ДНК определяются преимущественно CPD. Относительный вклад окислительных реакций в общее формирование фотопродуктов ДНК составляет примерно 1%, если дополнительно учесть 6-4PP, которые образуются, как и CPD, путем прямого возбуждения пиримидиновых оснований фотонами УФВ. Сходные результаты получены также при измерении продукта окисления гуанина (8-oxodG) и CPD в облученной УФВ клеточной ДНК: отношение выходов этих фотопродуктов составляет около 1% [37].

Как уже сказано, существует несколько окислительных путей образования 8-oxodG в ДНК (рис. 4, 5). Однако механизмы, вовлекаемые в индуцированное УФВ формирование этого фотопродукта в клеточной ДНК, изучены недостаточно. Согласно данным, полученным в экспериментах с кератиноцитами человека, в окислении G-оснований ДНК может участвовать гидроксильный радикал (<sup>•</sup>OH) [46]. После присоединения <sup>•</sup>OH к C8 гуанина образуется 8-гидроксидигидрогуанил-радикал, в последующем одноэлектронном окислении которого формируется 8-oxodG [37, 42, 47]. Образование 8-гидроксидигидрогуанил-радикала – предшественника 8-oxodG – может инициироваться также путем фотосенсибилизированного одноэлектронного окисления dG, вызывающего на первой стадии процесса формирование катион-радикала dG<sup>•+</sup> с последующей реакцией его гидратации [37, 48, 49]. Считается, однако, что этот механизм формирования 8-oxodG в клеточной ДНК при действии фотонов УФВ маловероятен [12]. Третья возможность формирования 8-oxodG, основанная на данных модельных исследований, предполагает окисление гуанина синглетным кислородом [35], но доказательства генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в клеточной ДНК при воздействии УФВ пока отсутствуют.

*Индукцированные УФА окислительные реакции  
повреждения клеточной ДНК*

В последние два десятилетия молекулярным механизмам действия УФА на клеточные си-

стемы посвящены обширные и всесторонние исследования. Значительное внимание в этих исследованиях уделено роли различных АФК, генерируемых потенциальными эндогенными фотосенсибилизаторами, в инициации процессов окислительного повреждения клеточной ДНК, а также мембранных компонентов клеток. Установлено, что эти процессы вовлекаются в цитотоксические фотодинамические эффекты [13, 50] и канцерогенное действие УФА [51]. Клетки различных организмов, в том числе клетки кожи человека, содержат много хромофоров, поглощающих в области УФА, включая порфирины, флавины, птерины (Ptr), NADH и другие молекулы. Они отличаются разнообразными химическими структурами, локализацией в клетках и механизмами фотосенсибилизирующего действия [6]. Активностью фотосенсибилизатора окислительного стресса обладает и пигмент эпидермиса меланин, известный фотозащитной функцией [52]. Фотосенсибилизаторы вступают в окислительные реакции преимущественно в долгоживущих триплетных состояниях, на несколько порядков превышающих время жизни их синглетных возбужденных состояний. Это особенно важно для эффективной инициации реакций типа I, поскольку сенсибилизатор в триплетном состоянии может диффундировать в среде до столкновения с молекулой субстрата – донором электрона, тогда как в синглетном возбужденном состоянии он реагирует только в том случае, если уже находится в непосредственной близости от молекулы субстрата.

**Порфирины.** Среди соединений порфириновой природы в биологических системах наиболее распространен протопорфирин IX – классический сенсибилизатор фотодинамических реакций типа II. В абсорбционном спектре протопорфирина главный максимум находится в области 400–410 нм с небольшими пиками в области 500–620 нм. Вместе с тем протопорфирин интенсивно поглощает фотоны во всей области УФА, что расширяет спектральный диапазон его фотосенсибилизирующей активности, связанной с генерацией <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Тушение возбужденного триплетного состояния протопорфирина кислородом с образованием <sup>1</sup>O<sub>2</sub> происходит с высокой квантовой эффективностью [33]. С другой стороны, эффективность реакций отрыва электрона от большинства биомолекул у протопорфирина крайне низка. Поэтому он, в отличие от упомянутых выше сенсибилизаторов, почти не вовлекается в фотосенсибилизированные окислительные реакции типа I.

В ряде исследований протопорфирин и его производные идентифицированы как эндогенные сенсибилизаторы фотодинамических реакций в клеточных структурах, вызывающих

цитотоксический эффект у дрожжей [53]. В митохондриях протопорфирин sensibilизирует реакции перекисного фотоокисления липидов (ПФОЛ) [54]. Продукт ПФОЛ, малоновый диальдегид (МДА), содержится также в изолированных из клеток плазматических мембранах [54]. Как показано ранее [55, 56], реакции ПФОЛ инициируются преимущественно синглетным кислородом, фотогенерируемым мембраносвязанным sensibilизатором. На основании флуоресцентных характеристик, полученных при изучении фотовыцветания этого sensibilизатора [57], его можно отнести к продукту протопорфина хлоринового типа. Фотосensibilizированные им реакции ПФОЛ лежат в основе деструкции барьеров проницаемости плазматических мембран [56].

В связи с вопросом о вкладе продуктов ПФОЛ в цитотоксический эффект в клетках дрожжей представляет интерес работа, в которой показано, что электрофильные ненасыщенные альдегиды, включая МДА, образующиеся вследствие разложения нестабильных перекисей липидов, способны мигрировать по всей клетке и реагировать с гуанином ДНК. МДА присоединяется к 2-экзоциклической аминогруппе гуанина с последующей циклизацией и формированием после дегидратации циклического диола [58]. Вполне вероятно, что такого рода альдегидные аддукты могут образовываться в ДНК дрожжевой клетки в результате присоединения к основаниям гуанина продуктов ПФОЛ – процесса, эффективно sensibilizированного протопорфирином и его производными в клеточных структурах. В этом мог бы заключаться вклад ПФОЛ не только в фотодинамический цитотоксический эффект, но и в изменение спектра мутаций в ДНК. Данное предположение требует, однако, экспериментального подтверждения.

**Флавины.** Группу этих биологически значимых молекул составляют рибофлавин и его нуклеотидные производные – FMN и FAD. Система сопряженных двойных связей изоаллоксазинового кольца флавинов определяет их фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства. Спектры поглощения и возбуждения флуоресценции окисленных состояний флавинов имеют два максимума в области 300–500 нм – при 360 и 450 нм, а спектры флуоресценции – один максимум около 530 нм. При поглощении фотона УФА/синего света в изоаллоксазиновом кольце происходит перераспределение заряда и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения. В молекулах FMN и FAD, которые служат хромофорами в сенсорных фоторецепторных белках, фотохимические реакции, вовлекающие перенос электрона/протона, индуцируют сигнальные и регуляторные процессы в живых си-

стемах. В ДНК-фототилазах флавиновый кофактор в форме FADH<sup>-</sup> в фотовозбужденном состоянии непосредственно участвует в репарации УФ-индуцированных CPD и 6-4PP путем переноса на них электрона [59–61].

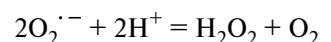
В отличие от прочно связанных с белками хромофоров FMN и FAD свободный рибофлавин при фотовозбуждении проявляет выраженную sensibilizированную активность. Так как в возбужденном состоянии рибофлавин приобретает сильные окислительные свойства, его относят к фотосensibilizаторам реакций типа I. Вместе с тем рибофлавин может фотосensibilizировать реакции типа II, поскольку способен генерировать <sup>1</sup>O<sub>2</sub> с квантовым выходом около 0.5 [62]. Действие рибофлавина как фотосensibilizатора типа I продемонстрировано при изучении формирования сшивок ДНК-белок, которые возникают с участием ионизированных оснований нуклеотидов, преимущественно G-оснований [32]. Интересно в этой связи отметить, что рибофлавин может образовывать комплексы с пуринами в растворе, о чем свидетельствует тушение его флуоресценции. Как показано в исследовании с модельными соединениями, фотосensibilizированная рибофлавином генерация G<sup>+</sup> в олигонуклеотиде TGT инициирует нуклеофильную реакцию с ε-аминогруппой центрального лизина в пептиде, состоящем из трех лизинов. Основной фотопродукт этой реакции – аддукт между гуанином и лизином, который образуется при добавлении остатка лизина к C8 гуанина [63]. В последующих теоретических работах, рассматривающих ДНК и пептиды/полиамины, получена дополнительная информация, уточняющая механизм образования сшивок гуанин–лизин [64, 65].

По механизму типа I может происходить также фотосensibilizированное рибофлавином окисление G-оснований в ДНК. Показано, что воздействие УФА (365 нм) приводит к формированию 8-oxodG посредством переноса электрона к триплетному возбужденному состоянию рибофлавина с образованием интермедиатов – анион-радикала рибофлавина и dG<sup>+</sup> [66]. Для объяснения формирования 8-oxodG в клеточной ДНК при воздействии УФА на культивируемые клетки млекопитающих в присутствии рибофлавина предложен механизм, основанный на гидратации dG<sup>+</sup>. В соответствии с полученными данными предполагается потенциальная роль фотосensibilizированного рибофлавином повреждения ДНК в канцерогенезе кожи [67].

**Птерины (Ptr).** Эти широко распространенные в живых организмах гетероциклические соединения представляют собой сопряженные системы двух колец – пиримидинового и пи-

разинового. Семейство Pter включает множество производных, которые различаются природой боковых заместителей, присоединенных к пиразиновому кольцу. К ним относятся окисленная форма Pter, 7,8-дигидроптерин (7,8-dihydropterin, H<sub>2</sub>Pter), 6-формилптерин (6-formylpterin, For), 6-карбоксиптерин (6-carboxypterin, Car), неоптерин (neopterin, Nep), биоптерин (biopterin, Bip), 7,8-дигидробиоптерин (7,8-dihydrobiopterin, H<sub>2</sub>Bip) и 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, H<sub>4</sub>Bip), а также фолиевая кислота (folic acid—pteroyl-L-glutamic acid, PteGlu). В живых системах некоторые Pter выполняют биологические функции, действуя, в том числе, как коферменты, в реакциях, связанных с синтезом физиологически активных соединений (H<sub>4</sub>Bip) или пуриновых и пиримидиновых оснований (PteGlu). 5,10-Метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate) — одно из производных PteGlu — присутствует в ДНК-фотолиазах как светособирающая антенна, передающая энергию возбуждения на каталитический FADH<sup>-</sup> [60].

Известно, что некоторые производные Pter вовлекаются в фотобиологические процессы, поэтому изучение их фотохимических и фотофизических свойств вызывает неослабевающий интерес у исследователей. При возбуждении в области УФА (365 нм) эти биомолекулы могут флуоресцировать с максимумом при 440–450 нм, генерировать АФК (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) и подвергаться фотоокислительной деградации с образованием различных продуктов, которые тоже могут обладать сенсibiliзирующей активностью [68]. Под действием солнечного света Pter накапливаются в коже человека и, генерируя в возбужденном состоянии АФК, вызывают фотоокислительный стресс, который особенно заметно проявляется при витилиго и приводят к образованию белых (депигментированных) пятен в коже [69]. Накопление в них Bip обусловлено окислением H<sub>4</sub>Bip пероксидом водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Установлено, что фотоокисление Bip индуцирует формирование потенциального фотосенсибилизатора (птерин-6-карбоновая кислота) и значительного количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [69]. Как показано в последующих экспериментальных и теоретических исследованиях, реакции окисления H<sub>4</sub>Bip могут происходить по механизмам фотосенсибилизации как типа I, так и типа II [70, 71]. В окисленной форме Pter при возбуждении УФА способны генерировать АФК в процессах переноса энергии (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) или электрона (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) триплетным состоянием Pter. Формирование O<sub>2</sub><sup>·-</sup> в результате переноса электрона между анион-радикалом Pter<sup>-</sup> и O<sub>2</sub> приводит к образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в реакции диспропорционирования:



H<sub>2</sub>Pter не генерирует <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, но окисляется в присутствии <sup>1</sup>O<sub>2</sub> с высокой константой скорости, образуя H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и Pter-производные, которые могут быть сенсibiliзаторами <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [68].

При изучении генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> производными Pter установлено, что квантовые выходы образования <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в водном растворе сильно зависят от химической природы их боковых заместителей, а также от pH среды. В этих экспериментах значения квантовых выходов определяли путем анализа фосфоресценции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> при 1270 нм после возбуждения Pter в области УФА (337 нм) [72]. Согласно полученным данным, наиболее эффективно сенсibiliзируют <sup>1</sup>O<sub>2</sub> For, Bip, Car и Nep с квантовыми выходами в зависимости от pH среды для каждого Pter в диапазонах 0.45–0.47, 0.34–0.40, 0.27–0.37 и 0.23–0.34 соответственно, поэтому эти производные Pter рассматриваются как возможные сенсibiliзаторы фотодинамических процессов *in vivo* [68]. Порядок величины квантовых выходов генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> некоторыми производными Pter оценен также на основе их фотофизических характеристик, рассчитанных методами квантовой химии [73].

Индукцированная УФА генерация Pter-производными O<sub>2</sub><sup>·-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в водных растворах может происходить по двум различным механизмам. В основе первого механизма лежит процесс переноса электрона от молекулы донора электрона к триплетному состоянию Pter, что вызывает его переход в анион-радикал Pter<sup>-</sup>. При взаимодействии Pter<sup>-</sup> с O<sub>2</sub> формируется O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, реакция диспропорционирования которого приводит к образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [74]. Второй механизм генерации O<sub>2</sub><sup>·-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> связан с окислением интермедиата, который возникает при воздействии УФА на Pter-производные Bip и Nep. Показано, что интермедиат (наиболее вероятно, формил-5,8-дигидроптерин) быстро окисляется кислородом, переходя в For. В этой реакции образуются также O<sub>2</sub><sup>·-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Завершается окислительный процесс фотоиндуцированным превращением For в Car и дополнительным образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [75, 76]. Как отмечено выше, For и Car проявляют эффективность и как фотосенсибилизаторы <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

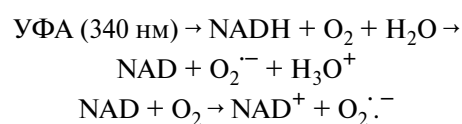
Фотохимическое образование <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяет сенсibiliзирующие свойства Pter, которые проявляются в их способности индуцировать при воздействии УФА окислительное повреждение биомолекул [77, 78]. Фотосенсибилирующая активность соединений Pter была впервые показана на ДНК [79, 80]. В даль-

нейших работах, направленных на изучение механизмов фотосенсибилизирующего действия Ptr, в качестве окисляемых молекул использовали пуриновый нуклеотид dGMP [81, 82]. Установлено, что при индуцированном окислении dGMP птеринами (Ptr, Vip, For и Cap) в нейтральной форме, в которой они присутствуют в нейтральной и кислой среде, преобладает механизм фотосенсибилизации типа I. Этот механизм вовлекает инициирующий перенос электрона от нуклеотида к триплетному возбужденному состоянию Ptr, сопровождаемый формированием  $\text{Ptr}^{\cdot-}$  и катион-радикала  $\text{dGMP}^{\cdot+}$ , депротонирование и гидратация которого приводят к окислительной деградации нуклеотида. В отсутствие  $\text{O}_2$  эти стадии окислительного процесса блокируются из-за рекомбинации радикалов  $\text{Ptr}^{\cdot-}$  и  $\text{dGMP}^{\cdot+}$  и их перехода в исходные состояния. В щелочной среде отмеченные выше Ptr находятся в анионной форме и фотосенсибилизированное окисление dGMP может вовлечь реакции с участием  $^1\text{O}_2$  [83].

Как известно, гуанин имеет самый низкий из всех оснований нуклеотидов потенциал ионизации, поэтому большинство фотосенсибилизаторов типа I индуцируют только его одноэлектронное окисление. В этой связи представляют интерес данные, свидетельствующие о способности Ptr фотосенсибилизировать окисление тимина в пиримидиновом нуклеотиде (dTMP) [84]. Инициированный УФА перенос электрона от нуклеотида к триплетному состоянию Ptr приводит к формированию анион-радикала  $\text{Ptr}^{\cdot-}$  и катион-радикала  $\text{dTMP}^{\cdot+}$ . Катион-радикал находится в равновесии с депротонированной формой ( $\text{dTMP}'$ ), а  $\text{Ptr}^{\cdot-}$  протонируется до  $\text{PtrH}$ . В последующих реакциях этих радикалов с  $\text{O}_2$ , включающих генерацию  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\cdot\text{OH}$ , образуется ряд конечных продуктов деградации dTMP. В отсутствие  $\text{O}_2$  с участием отмеченных радикалов происходит еще один процесс. В основе этого процесса, который не наблюдали при действии других фотосенсибилизаторов, лежит связывание радикалов  $\text{PtrH}'$  и  $\text{dTMP}'$ , сопровождаемое образованием ковалентного аддукта  $\text{Ptr}-\text{dTMP}$ . Аддукт сохраняет спектроскопические свойства свободного Ptr за исключением уменьшения интенсивности его флуоресценции в составе аддукта. Важно отметить, что при воздействии УФА в отсутствие  $\text{O}_2$  аддукт между Ptr и основанием тимина формируется также в дцДНК [85]. Предполагается, что формирование такого аддукта может происходить и в клеточной ДНК. Это обосновано следующими фактами: во-первых, концентрация  $\text{O}_2$  в некоторых тканях может быть очень низкой; во-вторых, Ptr свободно проникает через биомембраны, т.е.

может находиться в ядре; в-третьих, концентрация Ptr, использованная в работе с изолированной ДНК, сопоставима с концентрацией Ptr в клетках кожи. В соответствии с приведенными выше данными, Ptr рассматриваются как эндогенные фотосенсибилизаторы, способные индуцировать генотоксические процессы [85].

**NADH** – восстановленная форма известного кофермента редокс-реакций NAD, который может находиться также в окисленной форме ( $\text{NAD}^+$ ). Эти формы различаются спектроскопическими характеристиками:  $\text{NAD}^+$  поглощает только в области длин волн короче 300 нм и не флуоресцирует, тогда как NADH имеет поглощение в области УФА с максимумом в абсорбционном спектре при 340 нм и флуоресцирует с максимумом в спектре флуоресценции около 450 нм. Важное свойство NADH – его способность при поглощении фотонов УФА генерировать  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в  $\text{O}_2$ -зависимых окислительных реакциях:



В последующих реакциях с участием  $\text{O}_2^{\cdot-}$  сначала путем диспропорционирования  $\text{O}_2^{\cdot-}$  образуется  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а затем  $\cdot\text{OH}$ , посредством реакции Фентона (показано выше). Как уже отмечалось, высокореакционноспособный радикал  $\cdot\text{OH}$  может вовлекаться в УФ-индуцированные процессы сенсibilизированного окислительного образования таких дефектов в ДНК, как продукты окисления пиримидиновых и пуриновых оснований, включая 8-oxodG, а также одноцепочечные разрывы. В одной из первых работ с использованием изолированной плазмидной ДНК, ингибиторов ферментов и тушителей АФК было показано, что в NADH-фотосенсибилизированном формировании одноцепочечных разрывов непосредственно участвует  $\cdot\text{OH}$ , а  $\text{H}_2\text{O}_2$  играет роль интермедиата на пути превращения первичного NADH-фотогенерируемого продукта ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) в  $\cdot\text{OH}$  [86]. Вероятно, формирование NADH-сенсibilизированных повреждений в ДНК клеток при воздействии УФА происходит по более сложному механизму, детальное изучение которого требует новых экспериментальных подходов.

*Роль повреждений ДНК в программированной смерти растительных клеток при облучении УФВ*

ДНК – одна из критических клеточных мишеней при воздействии УФВ на растения.

Важно отметить, что повышение уровня УФВ в биосфере, вызванное длительным истощением стратосферного озонового слоя, может уменьшать геномную стабильность растительных популяций. В ответ на индуцированные УФВ дефекты в ДНК (рассмотрены выше) в клетках активируются различные сигнальные пути, которые играют ключевую роль в сохранении целостности генома. К ним относится активация чекпойнтов повреждения ДНК, сопровождаемая остановкой клеточного цикла. Это увеличивает время репарации ДНК и предотвращает передачу поврежденных хромосом. Вместе с тем арест клеточного цикла может индуцировать процесс программированной клеточной смерти (ПКС), одной из распространенных форм которой является апоптоз – генетически контролируемый механизм, обеспечивающий устранение сильно поврежденных либо нерегулируемых клеток. Апоптоз характеризуется такими специфическими признаками, как, например, фрагментация ДНК, конденсация хроматина и сжатие клетки [2]. Эти морфологические признаки выявлены при программированной смерти растительных клеток, вызванной действием УФВ [87]. Кроме того, у растений идентифицирован ряд генов, вовлекаемых в ПКС в ответ на облучение УФВ [88].

Молекулярный механизм действия чекпойнтов повреждения ДНК в клетках растений включает сенсорные киназы *ATAxia-TELANGIEctasia-MUTATED* (ATM) и *ATAxia-TELANGIEctasia-MUTATED RAD3-RELATED* (ATR), детектирующие разные повреждения ДНК и инициирующие каскады трансдукции сигнала посредством фосфорилирования сигнальных чекпойнт-киназ. В растении *Arabidopsis thaliana* ATR участвует в повышении толерантности клеток к действию УФВ. Это подтверждается данными о повышенной чувствительности к УФВ ATR-дефицитного мутанта и высоком уровне смерти мутантных клеток в результате изменения чекпойнта в G2-фазе клеточного цикла. У BY-2-клеток табака выявлена прямая связь между накоплением в ДНК индуцированных УФВ повреждений (CPD и одноцепочечные разрывы), арестом клеточного цикла при переходе от G1 к S-фазе и высоким уровнем клеточной смерти [89]. На тех же BY-2-клетках показано, что в больших дозах УФВ индуцирует специфичную нуклеосомную фрагментацию ДНК, которая является неотъемлемым компонентом ПКС, а также типичные для апоптоза морфологические изменения – сжатие клетки и конденсацию хроматина в ядре [87]. Центральный компонент ПКС у растений – транскрипционный фактор *SUPPRESSOR OF GAMMARESPONSE 1* (SOG1) – регулирует большинство ответов на повреждение ДНК, включая транскрипцию, остановку клеточного

цикла и смерть клетки. Для функциональной активности SOG1 требуется его фосфорилирование АТМ-киназой [90].

#### *Роль различных УФ-индуцированных повреждений ДНК в канцерогенезе кожи человека*

Как отмечено выше, канцерогенез кожи человека связан с воздействием УФ-излучения солнца, причем обе области УФ-излучения (УФВ и УФА) могут индуцировать развитие меланомы и базальноклеточного рака. Ключевую роль в начальной фазе развития раковых опухолей играет УФ-индуцированное повреждение ДНК. Если фотопродукты в ДНК остаются нерепарированными или поврежденные клетки (меланоциты, кератиноциты) не устраняются в процессе апоптоза, то определенные дефекты ДНК проявляют мутагенные свойства, вызывая активацию онкогенов. Результаты обширных исследований последнего времени свидетельствуют, что УФВ и УФА вызывают разные типы и количества повреждений в ДНК меланоцитов и кератиноцитов, чем можно объяснить различия в спектрах мутаций в меланомах и карциномах. Известная система эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) репарирует димерные фотопродукты в ДНК и играет важную роль в предотвращении УФ-индуцированного рака кожи. С дефектами в NER связаны несколько редких генетических заболеваний, в том числе пигментная ксеродерма (*xeroderma pigmentosum*). Клетки таких пациентов сверхчувствительны к действию УФ-излучения. У больных пигментной ксеродермой на несколько порядков повышена вероятность развития рака кожи всех типов, включая меланому, что может свидетельствовать о вкладе пиримидиновых димеров в развитие меланомы и немеланомных типов рака кожи. С другой стороны, дефекты в эксцизионной репарации оснований, способные снижать репарацию окислительных повреждений оснований, в большинстве случаев не связаны с раком кожи [1].

**Базальноклеточная карцинома.** Этот тип рака кожи возникает из кератиноцитов, находящихся в базальном слое эпидермиса и подвергающихся неконтролируемому делению, что характерно для раковых клеток. Как известно, рак развивается из делящихся клеток, а не из полностью дифференцированных и более не способных к делению. УФ-индуцированные повреждения в ДНК кератиноцитов вызывают мутации только в том случае, если клетка поделится прежде, чем станет способной осуществить репарацию поврежденной ДНК. Имеет значение и тот факт, что разные дефекты в ДНК различаются по мутагенному потенциалу. Это особенно от-

носится к цитозинсодержащим димерным фотопродуктам, поскольку они значительно более мутагенны по сравнению с тиминсодержащими CPD и (6-4)PP [91]. Согласно результатам ряда исследований, основным классом фотопродуктов в ДНК при облучении УФА клеток и кожи человека являются CPD, что характерно для УФВ. Однако в отличие от УФВ-индуцированных димеров, которые содержат основания тимина и цитозина, УФА индуцирует в большей степени Т-содержащие димеры и не вызывает формирования (6-4)PP [3].

Значительный интерес представляют данные, полученные при изучении зависимости образования Т-содержащих димеров от проникновения фотонов УФВ или УФА1 в различные слои эпидермиса кожи человека. Показано, что количество димеров, индуцированных УФВ, уменьшается с увеличением глубины эпидермиса, тогда как их количество при действии УФА1 значительно возрастает с глубиной, достигая максимума в базальном слое эпидермиса. Ослабление активности УФВ с увеличением глубины эпидермиса объясняется присутствием в коже хромофоров, поглощающих фотоны этого излучения. Фотоны УФА1 в меньшей степени поглощаются верхними слоями эпидермиса и поэтому могут проникать глубже. Согласно выдвинутому предположению, повышенная чувствительность базального слоя эпидермиса, где находятся кератиноциты (и меланоциты), к генотоксическому действию УФА1 может быть связана с обратным дермальным рассеянием этого излучения (например, от коллагена), а также прямым эпидермальным рассеянием [92].

Главный индуцируемый УФА продукт и биомаркер окислительного повреждения ДНК, 8-oxodG, формируется в клетках и коже человека преимущественно в реакции, опосредованной  $^1\text{O}_2$ . Другие окислительные реакции, инициирующие образование 8-oxodG, а также малого количества окисленных пиримидиновых оснований и разрывов цепи ДНК, вовлекают ОН. Фермент репарации ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1) специфически репарирует 8-oxodG, предотвращая возникновение GC→TA-мутаций из этого фотопродукта. Фермент OGG1 слабо экспрессируется в базальном слое эпидермиса человека по сравнению с верхними слоями эпителия. Предполагается, что экспрессия OGG1 регулируется состоянием дифференцированности кератиноцитов, поэтому в дифференцированных клетках экспрессия фермента повышена. Соответственно, в базальном слое фотопродукт 8-oxodG репарируется медленнее, нежели в верхних слоях эпидермиса, и это может лежать в основе высокой чувствительно-

сти базального слоя эпидермиса к накоплению 8-oxodG. К тому же, в облученных УФА кератиноцитах с высоким выходом, в 3 раза превышающим количество 8-oxodG, образуются тиминсодержащие димеры, из которых могут развиваться мутации GC→AT, а мутации GC→TA возникают, вероятно, из 8-oxodG. Эти мутации обнаружены, соответственно, в генах *p53* и *Brm* немеланомных типов рака кожи человека. Уязвимость базального слоя эпидермиса в отношении накопления отмеченных фотопродуктов и мутаций позволяет предполагать, что кожа человека более чувствительна к канцерогенезу, индуцированному УФА, чем считалось ранее [91].

В последнее время появились сообщения, согласно которым под действием УФА1 (340–400 нм) в ДНК кератиноцитов возникают задержанные во времени “темновые” CPD и окисленные фотопродукты. Поскольку образование и этих фотопродуктов и соответствующих “световых” дефектов ингибировалось витамином Е, обладающим антиоксидантными свойствами, можно предположить, что в основе формирования этих повреждений лежат фотоокислительные реакции. Показано также формирование “темновых” CPD в коже человека через 2 ч после воздействия излучения с длиной волны 385 нм, которые сохранялись в коже в течение 24 ч [93, 94]. Изучение механизмов “световых” и последующих “темновых” стадий формирования CPD и других фотопродуктов в ДНК кератиноцитов представляется важной задачей для дальнейшего прояснения вклада УФА в канцерогенез кожи человека.

**Меланома.** Эта злокачественная опухоль происходит из эпидермальных меланоцитов. Меланоциты отличаются от кератиноцитов резистентностью к апоптозу и длительным временем жизни в коже, а также спектром мутаций в активированных онкогенах, которые могут возникать из другого класса УФ-индуцированных повреждений ДНК. При сравнительном определении дефектов в ДНК, формируемых под действием УФВ или УФА в меланоцитах и кератиноцитах человека, установлено, что CPD образуются с одинаковой эффективностью в обоих типах клеток, облученных как УФВ, так и УФА [95]. В то же время при воздействии УФА количество 8-oxodG в меланоцитах было в 2.2 раза выше, чем в кератиноцитах. Эти данные показывают, что продукты окислительных реакций, индуцируемых УФА, вносят больший вклад в повреждение ДНК меланоцитов, чем кератиноцитов, и это может быть связано с фотосенсибилизирующей активностью пигмента меланина, образующегося в меланоцитах. Важная роль меланина в индукции меланомы установлена в исследовании с применением УФ-излучения строго определенных длин волн



[96]. Согласно полученным данным, УФА (320–400 нм) индуцирует формирование в ДНК 8-oxodG – мутагенного окислительного повреждения, из которого могут образовываться GC→TA-трансверсии, и это требует присутствия меланина в меланоцитах. Действие УФВ (280–320 нм), в отличие от действия УФА, инициирует развитие меланомы независимо от присутствия пигмента и связано с прямым формированием CPD в ДНК.

В ряде работ показано, что воздействие УФВ или УФА на меланоциты человека, содержащие пигмент меланин, индуцирует задержанное на несколько часов образование CPD в темноте после их прямого фотохимического формирования [97]. В отличие от меланоцитов, содержащих меланин, облучение УФА беспигментных меланоцитов не вызывало образования “темновых” CPD. На основании защитного действия антиоксидантов предположили, что в формирование “темновых” CPD вовлекается окислительный процесс с участием меланина [97, 98]. Как известно, при клеточном ответе на УФ-индуцированный стресс через некоторое время ферментативно образуются  $O_2^{\cdot -}$  и  $NO^{\cdot}$ , а их рекомбинация генерирует пероксинитрит ( $ONOO^-$ ). Постулировано, что  $ONOO^-$  реагирует с мономерами меланина, образуя нестабильные диоксетаны вблизи ДНК, а после их распада в триплетно-возбужденные карбонилы в темноте формируются CPD путем триплет-триплетного переноса энергии от карбониллов к пиримидиновым основаниям ДНК [97–99]. Предложенный механизм химического возбуждения может лежать в основе перераспределения в составе CPD, а именно значительного возрастания количества димеров с цитозином и тиминном, которые более мутагенны по сравнению с тиминсодержащими димерами, индуцируемыми УФА.

В недавнем исследовании показана двойственная роль меланина (защитная и сенсibilизирующая) в формировании “световых” и “темновых” CPD в эпидермисе кожи типа Fitzpatrick (Fitzpatrick skin type, FST) I/II и VI при воздействии излучения, имитирующего излучение солнца [100]. Максимальное формирование “темновых” CPD наблюдали через 1–2 ч после облучения, вероятно в результате окислительных реакций, фотосенсibilизированных меланином. С другой стороны, в базальном слое FSTIV “световые” CPD не образовывались, что, возможно, связано со способностью меланина действовать в качестве фильтра, предохраняющего ДНК от проникновения УФ-излучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях последних лет получены новые результаты, способствующие более глубокому пониманию молекулярных механизмов фотохимических процессов повреждения ДНК, индуцированных УФВ и УФА. При изучении фотохимических реакций, которые не зависят от кислорода, установлено, что дефекты в ДНК могут формироваться как путем прямого поглощения фотонов УФВ (CPD и 6-4PP), так и с участием сенсibilизаторов, которые поглощают фотоны УФА и посредством ТТЕТ индуцируют триплетные состояния Т-оснований с последующим образованием CPD (но не 6-4PP). Механизм, предложенный для фотосенсibilизированного формирования CPD, состоит в том, что триплетное состояние Т-основания переходит сначала в бирадикальное состояние, которое распространяется на оба основания дипиримидинов, а затем из бирадикального интермедиата формируется CPD. Недавно, помимо внешних сенсibilизаторов (бензофенон, ацетофенон, 2'-метоксиацетофенон), внутри самой молекулы ДНК выявлены хромофоры, поглощающие фотоны УФА и обладающие сенсibilизирующей активностью, действуя по механизму ТТЕТ. К ним относятся 5-формилурацил и пиримидиновая субъединица 6-4PP, способная инициировать формирование CPD посредством ТТЕТ в модельной системе. Однако в повреждение ДНК этот фотосенсibilизированный процесс вносит очень малый вклад из-за быстрой фотоизомеризации 6-4PP в Dewar-изомер – главной индуцированной УФА реакции после образования в ДНК 6-4PP под действием УФВ.

Фотосенсibilизированное образование окисленных повреждений в ДНК, в отличие от формирования CPD, строго зависит от кислорода, а реакции фотосенсibilизированного окисления по механизму первичного процесса разделяют на два типа. Окислительные реакции типа I инициируются переносом электрона между фотовозбужденным сенсibilизатором и биомолекулой, в результате чего образуется пара радикалов, вступающих в реакции с  $O_2$ , и это вызывает образование АФК. Первичный механизм реакций типа II вовлекает перенос энергии от фотовозбужденного сенсibilизатора к  $O_2$ , что приводит к формированию  $^1O_2$ . Современные представления о механизмах начальных стадий фотосенсibilизированных окислительных реакций подробно изложены в соответствующем разделе статьи. Там же рассмотрены механизмы реакций типа I и типа II, индуцирующих окисление гуанина в 8-oxodG – главный фотопродукт и биомаркер фотосенсibilизированных окислительных реакций в ДНК.

В отдельном разделе представлена информация о фотосенсибилизирующих свойствах Ptg, рибофлавина, протопорфирина IX и NADH, которые имеют характерные особенности у каждого из этих сенсibilizаторов. На основании приведенных данных, полученных в модельных экспериментах, Ptg, NADH и рибофлавин можно рассматривать как потенциальные фотосенсибилизаторы в клеточных системах, однако прямые доказательства этого пока отсутствуют. Что касается протопорфирина IX и его производных, то они могут действовать в клетках как фотосенсибилизаторы окислительных цитотоксических процессов. Активностью фотосенсибилизатора окислительных реакций в меланоцитах обладает также пигмент эпидермиса меланин.

Данные о фотохимических реакциях в клеточной ДНК обсуждаются главным образом в аспекте роли различных УФ-индуцированных повреждений в мутагенезе и канцерогенезе кожи человека. Результаты исследований последнего времени свидетельствуют, что УФВ и УФА вызывают в ДНК меланоцитов и кератиноцитов дефекты разного типа и в разных количествах, и этим можно объяснить различия в спектрах мутаций у меланом и карцином. Из сравнительного определения дефектов в ДНК, индуцированных УФВ или УФА в меланоцитах и кератиноцитах человека, следует, что продукты окислительных реакций, формируемые при облучении УФА, вносят больший вклад в повреждение ДНК меланоцитов, чем кератиноцитов, что может быть связано с фотосенсибилизирующей активностью пигмента меланина, образующегося в меланоцитах. О важной роли меланина в индукции меланомы при облучении меланоцитов УФА свидетельствуют данные, согласно которым для формирования в ДНК 8-oxodG и последующего возможного образования GC→TA-трансверсий требуется присутствие пигмента меланина в меланоцитах. В противоположность этому УФВ инициирует развитие меланомы из беспигментных меланоцитов, и его действие связано с прямым формированием CPD в ДНК. Значительный интерес вызывают недавние сообщения о том, что под действием УФА1 в ДНК кератиноцитов возникают задержанные во времени “темновые” CPD и окисленные фотопродукты, в основе формирования которых могут лежать фотоокислительные реакции. Раскрытие молекулярных механизмов первичных фото процессов и последующих “темновых” стадий формирования CPD и других фотопродуктов в ДНК кератиноцитов представляется одной из важных задач дальнейших исследований, направленных на выяснение роли УФА в канцерогенезе кожи человека. Аналогичные результаты получены недавно при воздействии УФА на меланоциты человека, содержащие пигмент меланин, который,

как предполагается, участвует в окислительном процессе формирования “темновых” CPD. Согласно выдвинутой гипотезе, этот процесс связан с химическим возбуждением карбониллов и триплет-триплетным переносом энергии к пиримидиновым основаниям ДНК. Изучение молекулярных основ фотосенсибилизирующей активности меланина и его вовлечения в химическое возбуждение компонентов окислительных реакций, инициирующих формирование “темновых” CPD, представляется важным в аспекте совершенствования способов предотвращения канцерогенеза кожи человека при воздействии УФ-излучения разных длин волн.

Работа выполнена в рамках научного проекта Государственного задания МГУ № 121032 500058-7.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и людей в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfeifer G.P., Besaratinia A. (2012) UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 90–97.
2. Фрайкин Г.Я. (2018) Сигнальные механизмы, регулирующие различные ответы растительных клеток на действие УФВ-излучения. *Биохимия*. **83**, 972–980.
3. Cadet J., Douki T. (2018) Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1816–1841.
4. Mullenders L.H.F. (2018) Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1842–1852.
5. Schuch A.P., Moreno N.C., Schuch N.J., Menck C.F.M., Garcia C.C.M. (2017) Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 110–124.
6. Wondrak G.T., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 215–237.
7. Cadet J., Mouret S., Ravanat J.-L., Douki T. (2012) Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochem. Photobiol.* **88**, 1048–1065.
8. Hu J., Adebali O., Adar S., Sancar A. (2017) Dynamic maps of UV damage formation and repair for the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6758–6763.

9. Johann to Berens P., Molinier J. (2020) Formation and recognition of UV-induced DNA damage within genome complexity. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6689.
10. Moan J., Porojnicu A.C., Dahiback A. (2008) Ultra-violet radiation and malignant melanoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **624**, 104–116.
11. Ting W., Schultz K., Cac N.N., Peterson M., Walling H.W. (2007) Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *Int. J. Dermatol.* **46**, 1253–1257.
12. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* **91**, 140–155.
13. Фрайкин Г.Я. (2016) *Молекулярные механизмы деструктивных, защитных и регуляторных фотобиологических процессов*. Москва: АР-Консалт, 88 с.
14. Schreier W.J., Gilch P., Zinth W. (2015) Early events of DNA photodamage. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **66**, 497–519.
15. Martinez-Fernandez L., Improta R. (2018) Sequence dependence on DNA photochemistry: a computational study of photodimerization pathways in TpdC and dCpT dinucleotides. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 586–591.
16. Schreier W.J., Kubon J., Regner N., Haiser K., Schrader T.E., Zinth W., Clivio P., Gilch P. (2009) Thymine dimerization in DNA model systems: cyclobutane photolesion is predominantly formed via the singlet channel. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5038–5039.
17. Pilles B.M., Bucher D.B., Liu L., Clivio P., Zinth W., Schreier W.J. (2014) Mechanism of the decay of thymine triplets in DNA single strands. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 1616–1622.
18. Liu L., Pilles B.M., Gontcharov J., Bucher D.B., Zinth W. (2016) Quantum yield of cyclobutane pyrimidine dimer formation via the triplet channel determined by photosensitization. *J. Phys. Chem. B.* **120**, 292–298.
19. Douki T., Berard I., Wack A., Andra S. (2014) Contribution of cytosine-containing cyclobutane dimers to DNA damage produced by photosensitized triplet-triplet energy transfer. *Chem. Eur. J.* **20**, 5787–5794.
20. Markovitsi D. (2016) UV-induced DNA damage: the role of electronic excited states. *Photochem. Photobiol.* **92**, 45–51.
21. Chung L.H., Murray V. (2018) An extended sequence specificity for UV-induced DNA damage. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **178**, 133–142.
22. Cuquerella M.C., Lhiaubet-Vallet V., Cadet J., Miranda M.A. (2012) Benzophenone photosensitized DNA damage. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1558–1570.
23. Aparici-Espert I., Garcia-Lainez G., Andreu I., Miranda M.A., Lhiaubet-Vallet V. (2018) Oxidatively generated lesions as internal photosensitizers for pyrimidine dimerization in DNA. *ACS Chem. Biol.* **13**, 542–547.
24. Frances-Monerris A., Hognon C., Miranda M.A., Lhiaubet-Vallet V., Monari A. (2018) Triplet photosensitization mechanism of thymine by an oxidized nucleobase: from a dimeric model to DNA environment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 25666–25675.
25. Frances-Monerris A., Lineros-Rosa M., Miranda M.A., Lhiaubet-Vallet V., Monari A. (2020) Photoinduced intersystem crossing in DNA oxidative lesions and epigenetic intermediates. *Chem. Commun.* **56**, 4404–4407.
26. Vendrell-Criado V., Rodriguez-Muniz G.M., Lhiaubet-Vallet V., Cuquerella M.C., Miranda M.A. (2016) The (6-4) dimeric lesion as a DNA photosensitizer. *Chem. Phys. Chem.* **17**, 1979–1982.
27. Douki T. (2020) Pyrimidine (6-4) pyrimidone photo-products in UVA-irradiated DNA: photosensitization or photoisomerization? *ChemPhotoChem.* **4**, 294–299.
28. Gontcharov J., Liu L., Pilles B.M., Carell T., Schreier W.J., Zinth W. (2019) Triplet-induced lesion formation at CpT and TpC sites in DNA. *Chem. Eur. J.* **25**, 15164–15172.
29. Lee W., Matsika S. (2020) Stabilization of the triplet biradical intermediate of 5-methylcytosine enhances cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) formation in DNA. *Chem. Eur. J.* **26**, 14181–14186.
30. Baptista M.S., Cadet J., Di Mascio P., Ghogare A.A., Greer A., Hamblin M.R., Lorente C., Nunez S.C., Ribeiro M.S., Thomas A.H., Vignoni M., Yoshimura T.M. (2017) Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* **93**, 912–919.
31. Cadet J., Loft S., Olinski R., Evans D., Bialkowski K., Wagner J.R., Dedon P.C., Moller P., Greenberg M.M., Cooke M.S. (2012) Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free. Radic. Res.* **46**, 367–381.
32. Baptista M.S., Cadet J., Greer A., Thomas A.H. (2021) Photosensitization reactions of biomolecules: definition, targets and mechanisms. *Photochem. Photobiol.* **97**, 1456–1483.
33. Красновский А.А., мл. (2004) Фотодинамическое действие и синглетный кислород. *Биофизика.* **49**, 305–321.
34. DiMascio P., Martinez G.R., Miyamoto S., Ronsein G.E., Medeiros M.H.G., Cadet J. (2019) Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem. Rev.* **119**, 2043–2086.
35. Dumont E., Gruber R., Bignon E., Morell C., Moreau Y., Monari A., Ravanat J.-L. (2016) Probing the reactivity of singlet oxygen with purines. *Nucl. Acids Res.* **44**, 56–62.
36. Ravanat J.-L., Dumont E. (2022) Reactivity of singlet oxygen with DNA, an update. *Photochem. Photobiol.* **98**, 564–571.
37. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. (2008) Oxidatively generated damage to the guanine moiety: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1074–1081.

38. Cadet J., Douki T., Ravanat J. (2010) Oxidatively generated damage to DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 9–21.
39. Фрайкин Г.Я., Беленикина Н.С., Рубин А.Б. (2018) Повреждающие и защитные процессы, индуцированные в клетках растений УФВ-излучением. *Изв. РАН. Сер. биол.* **45**(6), 583–592.
40. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L., Di Mascio P. (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 903–911.
41. Cadet J., Douki T. (2011) Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1005–1007.
42. Cadet J., Wagner J.R. (2014) Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: similarities and differences. *Arch. Biochem. Biophys.* **557**, 47–54.
43. Ravanat J.-L., Cadet J., Douki T. (2012) Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of *in vivo* oxidative stress. *Curr. Mol. Med.* **12**, 655–671.
44. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Di Mascio P., Wagner J.R. (2017) Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 13–34.
45. Cadet J., Douki T. (2011) Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutat. Res.* **711**, 3–12.
46. Pelle E., Huang X., Mammone T., Marenus K., Maes D., Frenkel K. (2003) Ultraviolet-B-induced oxidative DNA base damage in primary normal human epidermal keratinocytes and inhibition by a hydroxyl radical scavenger. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 177–183.
47. Greenberg M.M. (2012) The formamidopyrimidines: purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress. *Acc. Chem. Res.* **45**, 588–597.
48. Rokhlenko Y., Cadet J., Geacintov N.E., Shafirovich V. (2014) Mechanistic aspects of hydration of guanine radical cations in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5956–5962.
49. Cadet J., Wagner J.R., Shafirovich V., Geacintov N.E. (2014) One-electron oxidation reactions of purine and pyrimidine bases in cellular DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **90**, 423–432.
50. Aroun A., Zhong J.L., Tyrrell R.M., Pourzand C. (2012) Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A-radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 118–134.
51. Sander C.S., Chang H., Hamm F., Elsner P., Thiele J.J. (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Dermatol.* **43**, 326–335.
52. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Рубин А.Б. (2000) Индуцированные светом процессы защиты клеток от фотоповреждений. *Биохимия.* **65**, 865–875.
53. Strakhovskaya M.G., Shumarina A.O., Fraikin G. Ya., Rubin A.B. (1999) Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **49**, 18–22.
54. Шумарина А.О., Страховская М.Г., Туровецкий В.Б., Фрайкин Г.Я. (2003) Фотодинамическое повреждение субклеточных структур дрожжей с индуцированным накоплением эндогенного протопорфирина IX. *Микробиология.* **72**, 488–492.
55. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Пиняскина Е.В. (1995) О локализации порфиринового соединения в плазматических мембранах дрожжей и его участии в фотосенсибилизации перекисного окисления липидов. *Биохимия.* **60**, 1155–1160.
56. Fraikin G. Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. (1996) The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **34**, 129–135.
57. Страховская М.Г., Шумарина А.О., Фрайкин Г.Я., Рубин А.Б. (2002) Фотовыцветание флуоресценции эндогенного протопорфирина IX в дрожжевых клетках. *Биофизика.* **47**, 852–857.
58. Blair I.A. (2008) DNA adducts with lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* **283**, 15545–15549.
59. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Рубин А.Б. (2013) Биологические фоторецепторы светозависимых регуляторных процессов. *Биохимия.* **78**, 1576–1594.
60. Вечтомова Ю.Л., Телегина Т.А., Крицкий М.С. (2020) Эволюция белков семейства ДНК-фотолиаз/криптохромов. *Успехи биол. химии.* **60**, 277–316.
61. Фрайкин Г.Я. (2022) Фотосенсорные и сигнальные свойства криптохромов. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* **77**, 65–75.
62. Fuentes-Lemus E., Mariotti M., Reyes J., Leinisch F., Hagglund P., Silva E., Davies M.J., Lopez-Alarcon C. (2020) Photooxidation of lysozyme triggered by riboflavin is O<sub>2</sub>-dependent, occurs via mixed type 1 and type 2 pathways, and results in inactivation, site-specific damage and intra- and inter-molecular cross-links. *Free Radic. Biol. Med.* **152**, 61–73.
63. Perrier S., Hau J., Gasparutto D., Cadet J., Favier A., Ravanat J.-L. (2006) Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trylisine peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5703–5710.
64. Bignon E., Chan C.H., Morell C., Monari A., Ravanat J.-L., Dumont E. (2017) Molecular dynamics insights into polyamine-DNA binding modes: implications for cross-link selectivity. *Chemistry.* **23**, 12845–12852.
65. Chan C.H., Monari A., Ravanat J.-L., Dumont E. (2019) Probing interaction of a trylisine peptide with DNA underlying formation of guanine-lysine cross-links: insights from molecular dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 23418–23424.

66. Ito K., Inoue S., Yamamoto K., Kawanishi S. (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5'-site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J. Biol. Chem.* **268**, 13221–13227.
67. Yamamoto F., Nashimura S., Kasai H. (1992) Photosensitized formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in cellular DNA by riboflavin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 809–813.
68. Oliveros E., Dantola M.L., Vignoni M., Thomas A.H., Lorente C. (2011) Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules. *Pure Appl. Chem.* **83**, 801–811.
69. Rokos H., Beazley W.D., Schallreuter K.U. (2002) Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pterin-6-carboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 805–811.
70. Buglak A.A., Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. (2014) Photooxidation of tetrahydrobiopterin under UV irradiation: possible pathways and mechanisms. *Photochem. Photobiol.* **90**, 1017–1026.
71. Buglak A.A., Telegina T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. (2021) Autooxidation and photooxidation of tetrahydrobiopterin: a theoretical study. *Free Radic. Res.* **55**, 499–509.
72. Thomas A.H., Lorente C., Capparelli A.L., Martinez C.G., Braun A.M., Oliveros E. (2003) Singlet oxygen (<sup>1</sup>Δg) production by pterin derivatives in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, 245–250.
73. Buglak A.A., Telegina T.A., Kritsky M.S. (2016) A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 801–811.
74. Dantola M.L., Vignoni M., Gonzalez C., Lorente C., Vicendo P., Oliveros E., Thomas A.H. (2010) Electron-transfer processes induced by the triplet state of pterins in aqueous solutions. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1014–1022.
75. Vignoni M., Cabrerizo F.M., Lorente C., Thomas A.H. (2009) New results on the photochemistry of biopterin and neopterin in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* **85**, 365–373.
76. Vignoni M., Salum M.L., Erra-Balsells R., Thomas A.H., Cabrerizo F.M. (2010) <sup>1</sup>H NMR characterization of the intermediate formed upon UV-A excitation of biopterin, neopterin and 6-hydroxymethylpterin in O<sub>2</sub>-free aqueous solutions. *Chem. Phys. Lett.* **484**, 330–332.
77. Dantola M.L., Reid L.O., Castano C., Lorente C., Oliveros E., Thomas A.H. (2017) Photosensitization of peptides and proteins by pterin derivatives. *Pteridines*. **28**, 105–114.
78. Lorente C., Serrano M.P., Vignoni M., Dantola M.L., Thomas A.H. (2021) A model to understand type I oxidations of biomolecules photosensitized by pterins. *J. Photochem. Photobiol.* **7**, 100045.
79. Ito K., Kawanishi S. (1997) Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: sequence specificity and mechanism. *Biochemistry*. **36**, 1774–1781.
80. Hirakawa K., Suzuki H., Oikawa S., Kawanishi S. (2003) Sequence-specific DNA damage induced by ultraviolet A-irradiated folic acid via its photolysis product. *Arch. Biochem. Biophys.* **410**, 261–268.
81. Petroselli G., Dantola M.L., Cabrerizo F.M., Capparelli A.L., Lorente C., Oliveros E., Thomas A.H. (2008) Oxidation of 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate photoinduced by pterin: type I versus type II mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3001–3011.
82. Serrano M.P., Lorente C., Vieyra F.E.M., Borsarelli C.D., Thomas A.H. (2012) Photosensitizing properties of biopterin and its photoproducts using 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate as an oxidizable target. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 11657–11665.
83. Serrano M.P., Lorente C., Borsarelli C.D., Thomas A.H. (2015) Unraveling the degradation mechanism of purine nucleotides photosensitized by pterins: the role of charge-transfer steps. *ChemPhysChem*. **16**, 2244–2252.
84. Serrano M.P., Vignoni M., Lorente C., Vicendo P., Oliveros E., Thomas A.H. (2016) Thymidine radical formation via one-electron transfer oxidation photoinduced by pterin: mechanism and products characterization. *Free Radic. Biol. Med.* **96**, 418–431.
85. Estebanez S., Lorente C., Tosato M.G., Miranda M.A., Marin M.L., Lhiaubet-Vallet V., Thomas A.H. (2019) Photochemical formation of a fluorescent thymidine-pterin adduct in DNA. *Dyes Pigments*. **160**, 624–632.
86. Бурчуладзе Т.Г., Фрайкин Г.Я. (1991) Изучение механизма NADH-сенсibiliзируемого образования разрывов в ДНК при облучении ближним УФ-светом. *Молекуляр. биология*. **25**, 955–959.
87. Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Y.B. (2010) UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. *Environ. Exp. Bot.* **68**, 51–57.
88. Nawkar G.M., Maibam P., Park J.H., Sahi V.P., Lee S.Y., Kang C.H. (2013) UV-induced cell death in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1608–1628.
89. Takahashi S., Kojo K.H., Kutsuna N., Endo M., Toki S., Isoda H., Hasezawa S. (2015) Differential responses to high- and low-dose ultraviolet-B stress in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Front. Plant Sci.* **6**, 1–10.
90. Yoshiyama K., Kobayashi J., Ogita N., Ueda M., Kimura S., Maki H., Umeda M. (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* **14**, 817–822.
91. Halliday G.M., Cadet J. (2012) It's all about position: the basal layer of human epidermis is particularly susceptible to different types of sunlight-induced DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 265–267.
92. Tewari A., Grage M.M.L., Harrison G.I., Sarkany R., Young A.R. (2013) UVA1 is skin deep: molecular and

- clinical implications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 95–103.
93. Delinasios G.J., Karbaschi M., Cooke M.S., Young A.R. (2018) Vitamin E inhibits the UVA1 induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. *Sci. Rep.* **8**, 423.
94. Lawrence K.P., Douki T., Sarkany R.P.E., Acker S., Herzog B., Young A.R. (2018) The UV/Visible radiation boundary region (385–405 nm) damages skin cells and induces “dark” cyclobutane pyrimidine dimers in human skin *in vivo*. *Science*. **8**, 12722.
95. Mouret S., Forestier A., Douki T. (2012) The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 155–162.
96. Noonan F.P., Zaidi M.R., Wolnicka-Glubisz A., Anver M.R., Bahn J., Wielgus A., Cadet J., Douki T., Mouret S., Tucker M.A., Popratiloff A., Merlino G., De Fabo E.C. (2012) Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B requires melanin pigment. *Nat. Commun.* **3**, 884.
97. Premi S., Wallisch S., Mano C.M., Weiner A.B., Bacchiocchi N., Wakamatsu K., Bechara E.J., Halaban R., Douki T., Brash D.E. (2015) Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*. **347**, 842–847.
98. Premi S., Brash D.E. (2016) Unanticipated role of melanin in causing carcinogenic cyclobutane pyrimidine dimers. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1033588.
99. Premi S., Brash D.E. (2016) Chemical excitation of electrons: a dark path to melanoma. *DNA Repair (Amsterdam)*. **44**, 169–177.
100. Fajuyigbe D., Douki T., van Dijk A., Sarkany R.P.E., Young A.R. (2021) Dark cyclobutane pyrimidine dimers are formed in the epidermis of Fitzpatrick skin types I/II and VI *in vivo* after exposure to solar-simulated radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **34**, 575–584.

## Photochemical Processes to Cellular DNA Damage by UV Radiation of Different Wavelengths: Biological Consequences

G. Ya. Fraikin<sup>1</sup>\*, N. S. Belenikina<sup>1</sup>, and A. B. Rubin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: GFraikin@yandex.ru

UV radiation of sunlight induces in cellular DNA of different organisms photochemical reactions, which may lead to the development of series biological responses to arising lesions, including apoptosis, mutagenesis, and carcinogenesis. The chemical nature and the amount of DNA lesions depend on the wavelength of UV radiation. Photons of UV radiation in the region B (UVB, 290–320 nm) cause the production of two main defects, namely, cyclobutane pyrimidine dimers and, with a less yield, pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts; their formation is the result of the direct UVB photon absorption by DNA bases. Photons of UV radiation in the region A (UVA, 320–400 nm) induce only cyclobutane dimers that can be formed by triplet-triplet energy transfer from cellular chromophores, absorbing photons of this UV region, to DNA thymine bases. UVA is much more effective than UVB in the sensitized oxidatively lesion formation in DNA such as single strand breaks and oxidized bases; among those, 8-oxo-dihydroguanine is the most frequent since it can be produced from several oxidation processes. In recent years, multiple papers, reporting novel, more detailed information about molecular mechanisms of photochemical reactions underlying the formation of different lesions in DNA were published. The present review mainly aims at summarizing and analyzing data contained in these publications, particularly regarding oxidative reactions that are initiated by reactive oxygen species and radicals generated by potential endogenous photosensitizers such as pterins, riboflavin, protoporphyrin IX, NADH, and melanin. The role of specific DNA photoproducts in genotoxic processes induced in living systems by UV radiation of different wavelengths, including human skin carcinogenesis, is discussed.

**Keywords:** UV radiation, DNA photochemistry, photooxidation reactions, cellular sensitizers, DNA lesions, biological consequences

УДК 577.21

## МЕТОДЫ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ И ПРОГРАММЫ ДИЗАЙНА ГИДОВЫХ РНК

© 2024 г. Е. В. Михайлова<sup>а</sup>, \*, Б. Р. Кулуев<sup>а</sup>, Г. А. Геращенко<sup>а</sup>, Д. А. Чемерис<sup>а</sup>, Р. Р. Гарафутдинов<sup>а</sup>, А. Р. Кулуев<sup>а</sup>, Ан. Х. Баймиев<sup>а</sup>, Ал. Х. Баймиев<sup>а</sup>, А. В. Чемерис<sup>а</sup>

<sup>а</sup> *Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия*

\*e-mail: mikhele@list.ru

Поступила в редакцию 18.04.2023 г.

После доработки 22.05.2023 г.

Принята к публикации 09.06.2023 г.

Технология CRISPR/Cas активно применяется для редактирования геномов различных организмов уже 10 лет. Этот метод, позволяющий вносить двухцепочечный разрыв в нужный участок ДНК, произвел революцию в биоинженерии. Разработан также метод редактирования азотистых оснований (Base Editing, BE), в котором мутантная нуклеаза Cas (никаза), сшитая с дезаминазами и некоторыми другими ферментами, вносит в ДНК только одноцепочечные разрывы. С помощью этого метода можно производить замены, используя транзиции A→G и C→T и только один тип трансверсий C→G. Чуть более трех лет назад появился еще один вариант CRISPR/Cas – праймированное редактирование (прайм-редактирование, или Prime Editing). В отличие от BE, никаза здесь сшита с обратной транскриптазой, способной строить новую цепь по матрице *peg*РНК (*prime editing guide*) – удлиненной гидовой РНК с дополнительной последовательностью на 3'-конце. Прайм-редактирование позволяет вносить в эту последовательность нужные мутации, а также любые замены и индели азотистых оснований без использования специальной донорной ДНК. В представленном обзоре кратко рассмотрены варианты прайм-редактирования с акцентом на редактирование геномов растений. Определенное внимание уделено программам дизайна *peg*РНК, а также эффективности редактирования. Появление различных вариантов прайм-редактирования обусловлено потенциальными возможностями высокоточного внесения разноплановых изменений (с довольно низкой частотой нецелевых мутаций) в геномы различных организмов. Относительно невысокая эффективность прайм-редактирования заставляет исследователей предлагать все новые его варианты. Можно надеяться, что дальнейшее развитие технологии прайм-редактирования позволит настолько улучшить этот метод, что он займет достойное место в арсенале методов направленного воздействия на геномы любых организмов.

**Ключевые слова:** CRISPR, прайм-редактирование, *pCas9*, гидовые РНК, *peg*РНК, *ng*РНК, *web*-приложение

**DOI:** 10.31857/S0026898424010023, **EDN:** OHRIQW

### ВВЕДЕНИЕ

Метод CRISPR/Cas редактирования геномов – один из самых бурно развивающихся методов биоинженерии. Одна из важнейших особенностей этого метода состоит во внесении в целевой участок ДНК двухцепочечных разрывов, что повышает успешность процесса рекомбинации, но может приводить и к возник-

новению разных типов мутаций [1]. В настоящее время продолжается активное совершенствование системы для повышения ее точности и эффективности [2]. Важное значение для практического применения геномного редактирования имеет возможность внесения направленных мутаций, в том числе определенных нуклеотидных замен, инсерций и делеций. Сначала

Сокращения: PE – прайм-редактирование (Prime Editing); HA – гомологичное плечо (Homologous Arm); PAM – прилежащий к протоспейсеру мотив (Protospacer adjacent motif); RTT – матрица для обратной транскриптазы (Reverse Transcriptase Template); PBS – сайт связывания праймера (Primer Binding Site); РНП – рибонуклеопротеидный комплекс (ribonucleoprotein complex); *peg*РНК – гидовая РНК для прайм-редактирования (*prime editing guide* RNA); *sg*RNA – единая гидовая РНК (*single guide* RNA); *ng*RNA – единая РНК для внесения ников (*nicking sg*РНК).

был предложен метод редактирования (замены) отдельных азотистых оснований без внесения двухцепочечных разрывов, получивший название редактирование оснований (Base Editing, BE). Этот метод основан на использовании мутантной нуклеазы Cas (никазы), которая вносит одноцепочечный разрыв в ДНК. В зависимости от того, какой нуклеотид предполагается изменить, возможно редактирование азотистых оснований аденинового (ABE) или цитозинового (CBE) типа. К никазе nCas9 в этих случаях пришивают дополнительные ферменты – цитидиндезаминазу вместе с ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы или аденозиндезаминазу. Применительно к растениям эта технология подробно рассмотрена в обзоре [3].

Довольно перспективным вариантом геномного CRISPR/Cas-редактирования является прайм-редактирование (Prime Editing, PE), разработанное в лаборатории D.R. Liu [4]. PE имеет преимущества перед редактированием отдельных нуклеотидов, поскольку способен прицельно изменить определенный нуклеотид, тогда как при редактировании оснований возможны ошибки, особенно если в целевом участке находятся несколько одинаковых азотистых оснований или гомополимерный тракт. К тому же с помощью BE можно вносить замены путем транзаций A↔G и C↔T и только одного типа трансверсий C→G, а PE позволяет осуществлять все 12 возможных замен азотистых оснований. Кроме того, с помощью PE можно заменить сразу несколько нуклеотидов подряд, а также внести инсерцию или делецию без использования специальной донорной ДНК. PE позволяет осуществлять нокаут гена более направленно и эффективно, максимально исключая непредсказуемые мутации, возникающие при обычном CRISPR/Cas-редактировании с двухцепочечными разрывами. В начале своего развития технология PE была малоэффективной отчасти из-за отсутствия двухцепочечных разрывов, однако ее удалось усовершенствовать, в том числе добавив еще одну Cas-никазу, расщепляющую дополнительно нередигированную цепь ДНК после репарации редактированной [4].

Несмотря на то что метод PE появился совсем недавно, разработано уже значительное число его модификаций, и нет никаких сомнений в дальнейшем его развитии, что отчасти объясняется необходимостью повышения эффективности. Этот недостаток PE отмечен, в том числе в статье, посвященной 10-летию CRISPR/Cas-технологии и ее перспективам [5]. В PE задействованы Cas9-никаза, обратная транскриптаза и удлиненная гидовая РНК, поэтому все варианты улучшения данного метода предполагают различные модификации этих трех основных компонентов как по отдельности, так и в комплексе.

Прайм-редактированию, в том числе растительных геномов, посвящены несколько обзоров [6–16]. Появились и подробные протоколы проведения такого редактирования [17], в том числе на растительных объектах [18], а также важные усовершенствования, которые необходимо рассмотреть дополнительно. Существует множество программ для дизайна гидовых РНК (sgРНК, single guide), используемых в классическом CRISPR/Cas-редактировании [19–21]. Однако для PE их пока не так много, что связано не только с новизной метода, но и с более сложной структурой *pegРНК*, которая содержит в себе донорную последовательность.

В данном обзоре основной акцент сделан на PE растительных геномов, первые результаты которого появились уже весной 2020 г. [22], и с тех пор их количество неуклонно растет [23–25]. При этом внимание уделено и различным модификациям PE, предложенным для животных, включая клетки человека, поскольку через некоторое время многие из них наверняка будут адаптированы и к геномам растений.

#### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – PE1, PE2, PE3

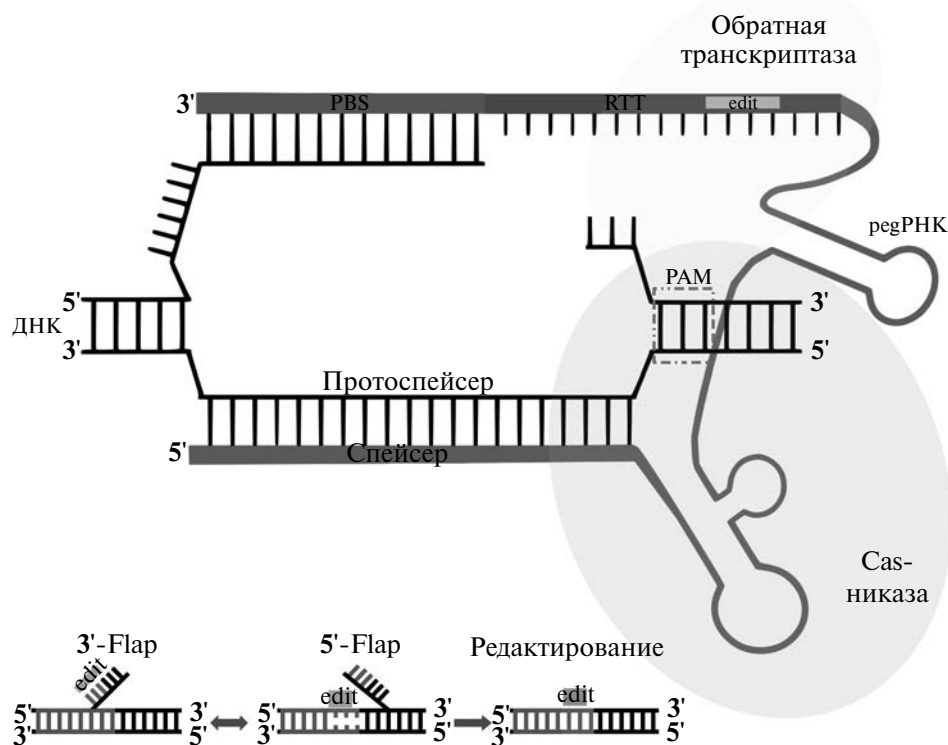
В 2019 г. было опубликовано описание сразу нескольких вариантов нового метода PE [4]. Все эти варианты основаны на использовании химерного белка, состоящего из никазы nCas9 (H840A), сшитой с обратной транскриптазой вируса лейкоза мышей Молони (M-MLV). При этом оба белка несли сигналы ядерной локализации (Nuclear Localization Signal, NLS) вируса SV40. Никаза nCas9 – это производное нуклеазы Cas9 дикого типа, узнающей прилежащий к протоспейсеру мотив PAM (Protospacer Adjacent Motif), участок NGG бактерии *Streptococcus pyogenes*. У никазы nCas9 нарушен домен HNH, тогда как домен RuvC остается каталитически активным, что определяет формирование этим ферментом только одноцепочечного разрыва. Химерный белок позволяет применять видоизмененную (удлиненную) гидовую РНК, так называемую *pegРНК*, несущую на 3'-конце дополнительную последовательность, состоящую из нескольких зон, одна из которых – PBS (сайт связывания праймера, Primer Binding Site) – служит местом отжига праймера – фрагмента редактируемого участка ДНК со свободным 3'-концом, образующимся при никировании мишени nCas9 и расплетании цепей под действием этого фермента. Другая зона *pegРНК* – RTT (Reverse Transcriptase Template) – представляет собой матрицу с намеченными изменениями нуклеотидных последовательностей для ее копирования обратной транскриптазой. Кроме того, в состав RTT входит участок HA (Homologous Arm), го-



мологичный ДНК-мишени за пределами места непосредственного редактирования, служащий для облегчения интеграции внесенных изменений в исходную последовательность ДНК. В результате такого РЕ образуются два типа цепей ДНК с так называемыми лоскутами (Flap). При этом один из них (3'-Flap) несет отредактированную последовательность, тогда как 5'-Flap представляет собой неизмененную исходную ДНК. В результате репарационных процессов в самой клетке происходит восстановление цельных последовательностей ДНК как подвергнутых редактированию, так и исходных, что, к сожалению, заметно снижает эффективность РЕ. Однако существует мнение, что 5'-Flap более подвержен воздействию структурно-специфичных эндонуклеаз и 5'-экзонуклеаз самой клетки. Описанный процесс схематично изображен на рис. 1. Нужно еще заметить, что вносить изменения в участок PAM желательно таким образом, чтобы исключить его дальнейшее узнавание никазой Cas9 и тем самым остановить возможное продолжение (повторного) редактирования.

В варианте РЕ1, оказавшемся востребованным практически лишь на этапе отработки технологии РЕ *in vitro*, использовали обратную транскриптазу M-MLV дикого типа с неоптимальными характеристиками, поэтому для улучшения этого фермента [4] использовали мута-

генез и отобрали пентамутант (D200N/L603W/T330P/T306K/W313F), который сшили с никазой nCas9. Вариант РЕ на их основе, названный РЕ2, превзошел предшественника РЕ1 в 1.6–5.1 раза на разных мишенях. Помимо улучшения свойств фермента M-MLV, проведена и оптимизация *reg*РНК в части протяженности PBS и GC-состава дополнительной последовательности – от 40 до 60%. Усовершенствование РЕ продолжилось, в результате чего был разработан вариант РЕ3 с подвариантом РЕ3b. Принципиальное отличие РЕ3 и РЕ3b от РЕ2 и РЕ1 состояло в участии второй никазы nCas9, вносящей дополнительный одноцепочечный разрыв, что заметно повысило эффективность получения желаемых мутаций. В РЕ3 *ng*РНК (*nicking sgRNA*) вносила дополнительный разрыв в ту же цепь на расстоянии 14–116 нуклеотидов от разрыва, полученного с помощью *reg*РНК, что повысило эффективность редактирования в 1.5–4.2 раза по сравнению с РЕ2. Подвариант РЕ3b, в свою очередь, оказался эффективнее РЕ3 в 13 раз благодаря тому, что дополнительный разрыв находился на неотредактированной цепи. С этой целью *ng*РНК к Cas9-никазе нацеливали на уже отредактированную последовательность. В целом в ходе этой пионерной работы [4] получены 19 вставок с наибольшим размером 44 п.н., 23 делеции с максимальным размером 80 п.н., 119 точечных мутаций, включая 83 тран-



**Рис. 1.** Схематичное изображение процесса прайм-редактирования геномной ДНК. НА – гомологичное плечо; RTT – матрица для обратной транскриптазы; edit – участок, содержащий мутации, который планируется внести в геном; PBS – сайт связывания праймера (другие пояснения в тексте).

сверсии, а также еще ряд изменений в геномах человека и мыши (в культурах клеток) без образования двухцепочечных разрывов.

Варианты PE, а также эффективность внесения изменений сравнивали во многих публикациях, однако численные показатели в большей степени зависят от выбранных мест редактирования, а также от используемого оборудования, методов и квалификации экспериментатора.

### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – PE4, PE5, PEmax

Под руководством D.R. Liu разработаны усовершенствованные варианты PE – PE4, PE5 и PEmax [26]. В ходе PE возникают участки с неполным спариванием, которые репарируются присущими клеткам механизмами, что снижает эффективность внесения целевых изменений. Одним из решений этой проблемы стало ингибирование данного процесса с помощью специфического доминантно-негативного белка MLH1dn человека, состоящего из 756 аминокислотных остатков. Ген этого белка транзientно экспрессировался с отдельной плазмиды. Таким образом, вариант PE2 превратился в PE4 (PE2+MLH1dn), а PE3 – в PE5 (PE3+MLH1dn), использование которых привело к повышению эффективности редактирования в несколько раз и одновременно уменьшило количество нежелательных инделей. Варианты PEmax (PE2|PE3|PE4|PE5)max получены в результате внесения двух дополнительных мутаций в SpCas9-никазу, а также добавления еще одного NLS (с-Мус) на С-конец химерного белка. Размещение NLS (с-Мус) на N-конец этого белка привело к получению варианта PE\* [27].

Помимо этого, в PEmax предлагалось использовать защищенную от действия RNКаз гидродую РНК, названную epegРНК (engineered). Это улучшение позволило провести 191 редактирование 20 локусов в семи типах клеток млекопитающих. Причем в одном из случаев достигнуто 72-кратное улучшение по сравнению с PE2 [26]. Изучая влияние клеточных систем репарации неспаренных азотистых оснований на PE, обнаружили, что эффективность внесения целевых изменений в нуклеотидные последовательности в культурах клеток с несколькими нарушенными генами репарации могла увеличиваться вплоть до 17 раз [28].

### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ С НАТИВНОЙ CAS-НУКЛЕАЗОЙ – PEA1-NUC, PE-CAS9, PEn

В описанных вариантах PE в качестве основного фермента использовали никазу nCas9, делающую одноцепочечные разрывы в ДНК.

Позже стали применять комплекс обратная транскриптаза дикого типа – нуклеаза Cas9 с полноценными функционально активными доменами RuvC и HNH, обеспечивающими формирование двухцепочечных разрывов. Этот подход получил название PEA1-Nuc (all-in-one prime editing nuclease) [29], особенностью которого следует считать расположение на одной плазмиде всех элементов, необходимых для PE, включая дополнительную ngРНК и селективный маркер (ген устойчивости к пуромицину или *GFP*). В этом исследовании эффективность редактирования некоторых культур клеток человека достигала 95%, а инъекции компонентов редактирования в зиготы мышей приводили к корректным модификациям в 100% случаев.

Подобный химерный комплекс, состоящий из нуклеазы Cas9 и обратной транскриптазы M-MLV (PE-Cas9), использовали также в качестве вспомогательного, поскольку на его основе провели PE с парными pegРНК (более подробно описано в разделе о парном PE) [30].

Также описаны две стратегии PE с полноценной нуклеазой [31]. Первая подразумевала гомологичную репарацию (Homology-Directed Repair, HDR), основанную на гомологичных участках в мишени и в RTT. Вторая – негомологичную репарацию (Non-Homologous End Joining, NHEJ), приводящую к большему количеству случайных инделей. Метод с использованием полноценной нуклеазы как с HDR, так и с NHEJ получил название PEn (Prime Editor nuclease). Показано, что инсерция небольших фрагментов ДНК происходила с большей эффективностью, чем в варианте PE2 с теми же pegРНК. К тому же в данной работе используемые для редактирования клетки человека обрабатывали ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы, что также повысило специфичность редактирования. Позже вариант PEn был улучшен путем использования убиквитинированных белков, действующих как ингибиторы NHEJ, что заметно повысило эффективность редактирования [32]. Этот подход получил название uPEn (ubiquitin).

### МОДИФИКАЦИИ pegРНК

Поскольку длина pegРНК больше, чем у sgРНК, и часть ее молекулы при формировании РНП-комплексов не экранируется Cas-белком, то она в большей степени, чем обычная sgРНК, подвержена разрушению RNКазами, поэтому необходимо защищать свободный 3'-конец pegРНК. Например, обеспечить защиту pegРНК можно с помощью расположенного на 3'-конце стабильного структурированного мотива (псевдоузла). Такая pegРНК получила

обозначение *ereg* (engineered) [33]. В качестве псевдоузлов были выбраны аптамер *evorgeQ<sub>1</sub>*, имеющий относительную небольшую длину (42 нуклеотида), а также последовательность *mpknot* вируса M-MLV. Использование *mpknot* позволило не только обеспечить защиту от нуклеаз, но и могло способствовать повышенной активности обратной транскриптазы этого вируса в составе химерного белка при PE. Изучение влияния *ereg*РНК на эффективность PE генома риса показало, что вариант PPE3-*evorgeQ<sub>1</sub>* заметно улучшил введение замен нуклеотидов в целый ряд мишеней, тогда как вариант PPE3-*mpknot* проявил себя несколько хуже, но обеспечил преимущество перед обычной *ereg*РНК в немодифицированной системе PPE3 [34].

Размещение на 3'-конце *ereg*РНК довольно протяженного структурированного мотива (*xg*РНК), устойчивого к вирусной экзонуклеазе, привело к созданию *xg-ereg*РНК и подхода *xgPE*. Использование *xg-ereg*РНК в несколько раз увеличило эффективность получения коротких инделей [35]. Получена также *ereg*РНК, названная MS2*eregR* [36], содержащая на 3'-конце довольно протяженный аптамер MS2 со стабильной вторичной структурой. Такая гидовая РНК способствовала значительному улучшению PE ряда локусов в протопластах риса. Недавно было показано, что использование транскрипционного фактора Р65 в дополнение к MS2 повысило эффективность систем PE3 и PE5 [37].

Внесение в участок RTT *ereg*РНК единичных мутаций, не приводящих к аминокислотным заменам, заметно повысило эффективность нескольких вариантов PE. Новая форма гидовой РНК получила название *speg*РНК, а варианты редактирования – *sPE3* и *sPE5* [38]. Описаны также варианты *aPE3* и *aPE5*, в которых использовали *areg*РНК (*altered*). Структура *areg*РНК отличалась тем, что в малой шпильке константной части за счет двух замен образовалась дополнительная GC-пара, упрочившая третичную структуру молекулы, что оказало положительное воздействие на эффективность PE [38].

Расположение на 3'-конце *ereg*РНК G-квадруплексной структуры (17–18 нуклеотидов – G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>) показало ее пригодность для защиты гидовой РНК. Этот вариант PE получил название G-PE [39].

Во избежание циклизации *ereg*РНК за счет гомологии части спейсерной последовательности и PBS-участка предложено дополнительно удлинять *ereg*РНК, добавляя на ее 3'-конец 20 нуклеотидов, отвечающих за связывание со специфической нуклеазой *Csy4* [40]. Эта нуклеаза может выполнять и другие полезные функции. Так, для варианта PE3, в котором требуется так-

же обычная гидовая *sg*РНК, *ereg*РНК и *ng*РНК экспрессировались полицистронно и расщеплялись РНКазой *Csy4*, ген которой располагался в конструкции, кодирующей химерный белок из никазы и обратной транскриптазы. При этом отмечена возможность трудностей с доставкой к месту редактирования необходимых компонентов, но в целом этот подход, названный *ePE* (*enhanced*), позволил несколько повысить эффективность PE [40].

Предложена также *ereg*РНК, разделенная на две части – на обычную *ng*РНК и на так называемую *pet*РНК (*prime editing template*), представляющую собой объединение PBS- и RTT-участков *ereg*РНК с аптамерной шпильчатой структурой. Причем *pet*РНК имеет как линейную, так и кольцевую форму, повышающую ее устойчивость к действию нуклеаз, генерируемую с помощью специальных рибозимов [41].

Нежелательными в *ereg*РНК являются участки из четырех и более остатков урацила подряд, поскольку они приводят к терминации цепи, транскрибируемой РНК-полимеразой III, промотор которой обычно используют в генно-инженерных конструкциях при геномном редактировании методом CRISPR/Cas. Чтобы обойти это ограничение, предложено пользоваться промоторами РНК-полимеразы II [42]. Этот подход к PE получил название *pPE3*. Следует заметить, что если синтезировать *ereg*РНК химическим путем, то проблем с подобными последовательностями не возникает.

#### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – *pPE2*, *ePE*, *PE-P3*, *ENPPE2*, *O-PE*

В первой работе по PE растений [22] была проведена оптимизация кодонов гена химерного фермента и использован убиквитиновый промотор *Ubi-1*. Это позволило провести редактирование геномов пшеницы и риса, причем в последнем случае удалось достичь регенерации 21.8% трансформантов. Разработан вариант *pPE2* для растений [43], в котором использовали оптимизированную для улучшенной экспрессии в растениях пентамутантную обратную транскриптазу M-MLV, шитую с никазой *nCas9* через 33-аминокислотный линкер. С помощью *pPE2*, доставляемого в каллус риса с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, удалось успешно отредактировать несколько последовательностей. В отдельных случаях эффективность редактирования превышала 30%, но при этом отмечалась сильная зависимость от выбранной мишени. В варианте *pPE3/pPE3b* в ту же генно-инженерную конструкцию под другим промотором был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий дополнительную *ng*РНК. Однако в отличие от животных

клеток это не привело к повышению эффективности редактирования [43]. Сообщалось также о разработке нескольких версий прайм-редактирования растений риса, обозначенных PPE3/PPE3b-V01/V02, использующих оптимизацию кодонов для трансляции [25].

Вскоре был предложен способ РЕ ДНК риса с использованием инактивированного домена RTT M-MLV, ответственного за активность РНКазы Н, способной разрушить цепь РНК в гетеродуплексах *peg*РНК с протоспейсером [44]. Метод получил название ePPE (engineered Plant Prime Editor), в ходе разработки которого в РНКазу Н ввели мутацию D524N, а также удалили весь домен, отвечающий за данную активность этого фермента. Для соединения *nCas9* (H840A) никазы с измененной обратной транскриптазой M-MLV ( $\Delta$ RNase H) использовали линкер из 32 аминокислотных остатков вирусного белка нуклеокапсида с шаперонной активностью. Испытание этих конструкций в РЕ протопластов риса выявило превосходство последнего варианта и в целом преимущество ePPE над обычным РЕ (1.8–3.4 раза). При этом не отмечено увеличения частоты нецелевого редактирования.

Практически одновременно возможность снижения потенциального вреда домена РНКазы Н при РЕ изучали на животных [45]. Удаление этого домена позволило уменьшить размер весьма крупной химеры белков *nCas9* и M-MLV, кодирующая часть в которых составляет около 6.35 т.п.н., что приводит к определенным проблемам при доставке генно-инженерной конструкции к месту редактирования, что, впрочем, не столь существенно при работе с растениями. Укорочение фермента M-MLV привело к созданию белков из 497, 474, 418 и 362 аминокислотных остатков, но лишь первый из них оказался приемлемым для РЕ, названного компактным — *compact PE*. Укороченный химерный ферментный комплекс, доставляемый с помощью аденовирусного вектора (максимальная емкость которого составляет 4.8 т.п.н.) в клетки печени мыши, использовали при РЕ в формате РЕ3. Этот комплекс позволяет получать как делеции, так и вставки.

Несколько позднее удалили фрагмент ДНК длиной 471 п.н., кодирующий домен РНКазы Н, после чего обратная транскриптаза M-MLV была подвергнута дальнейшему укорочению. В результате кодирующая часть гена этого фермента уменьшилась на 621 п.н., что позволило успешно доставить его в клетки печени мыши с использованием аденовирусного вектора [46].

В первом и во всех последующих вариантах РЕ в химерном ферментном комплексе обрат-

ная транскриптаза M-MLV следовала за никазой *nCas9*, но возможно и иное их расположение [47]. При этом на примере редактирования трансгенных растений риса, протопластов кукурузы, а также клеток человека в отдельных случаях отмечено двух-трехкратное преимущество такой конструкции, содержащей участок RTT с множественными заменами, перед конструкциями с единичной заменой. Подобное редактирование названо *Prime Editor-Plant version 3* (PE-P3).

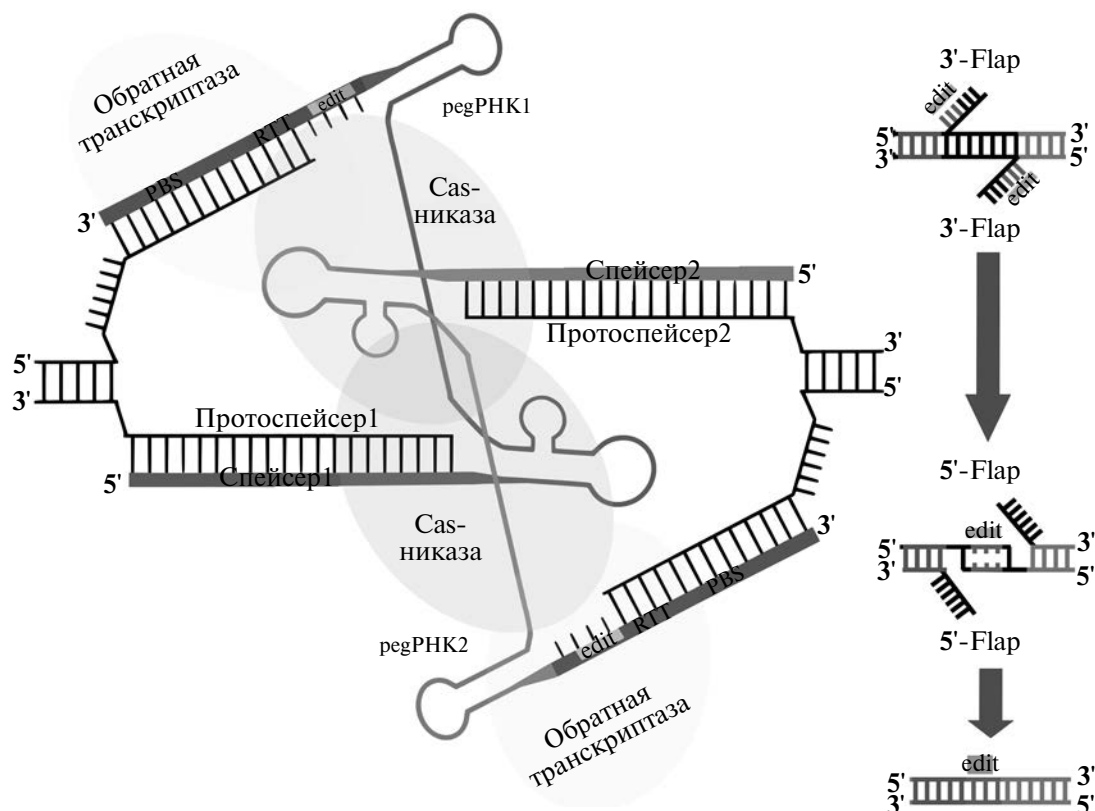
С использованием модифицированных гидовых РНК (*peg*РНК-*evopreQ<sub>1</sub>* и *peg*РНК-*mpknot*), а также композитного промотора создана целая группа векторов, обеспечивших 64 и 77% точных мутаций в отдельных локусах эмбрионного каллуса риса. Подход получил название *enPPE2* (*enhanced plant*) [48]. В другой работе при РЕ *A. thaliana* перебор различных промоторов и других компонентов привел к созданию варианта O-PE (*optimized-prime editor*) [49].

#### ПАРНОЕ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ — HOPE, PRIME-DEL, PEDAR, GRAND, WT-PE, TWINPE, BI-PE, PETI

Практически одновременно и независимо друг от друга несколько исследовательских групп начали разработку сшитых с обратной транскриптазой *Cas9*-никаз с соответствующими им парными *peg*РНК (рис. 2).

В парном РЕ одновременно используются две *peg*РНК, вносящие бреши в разные цепи ДНК. Это приводит к формированию каждой RTT 3'-Flap, комплементарных друг другу, что заметно увеличивает вероятность возникновения целевых мутаций. Благодаря такому подходу появляется возможность получить делеции и инсерции увеличенного размера.

Так, опубликованы данные о применении двух *nCas9*-никаз в методе, получившем название HOPE (*homologous 3'-extension mediated prime editor*) [50], особенностью которого можно считать нацеливание гидовых РНК на разные цепи ДНК, из-за чего они были названы S-*peg*РНК и AS-*peg*РНК (*sense* и *antisense* соответственно). К этим РНК подобраны участки S-PAM и AS-PAM соответственно. Также в RTT отсутствовали HA-последовательности, которые в этих двух *peg*РНК заменены последовательностями, комплементарными друг другу, что приводило к образованию двух 3'-Flap, готовых спариваться между собой. Это заметно повышало эффективность РЕ при получении делеций и инсерций по сравнению с вариантами РЕ2 и РЕ3.



**Рис. 2.** Схематичное изображение процесса парного прайм-редактирования геномной ДНК с использованием двух никаз. — гомологичное плечо; RTT — матрица для обратной транскриптазы; edit — участок последовательности, содержащий мутации, которые планируется внести в геном; PBS — сайт связывания праймера (другие пояснения в тексте).

Описано также парное PE, названное PRIME-Del [51] и ориентированное в первую очередь на получение протяженных делеций, одна из которых превышала 10 т.п.н. (10204 п.н.), и с эффективностью 1% локализовалась в локусе HPRT1 культуры клеток человека. Внесение делеции 546 п.н. в ген зеленого флуоресцентного белка, внедренного до этого в геномную ДНК человека, оказалось заметно более успешным. Помимо этих и ряда более коротких делеций, метод парного PE PRIME-Del позволил вносить в геном также небольшие инсерции (менее 100 п.н.).

Разработан схожий метод PEDAR (Deletion And Repair) — модификация PE-Cas9, особенность которого состоит в использовании полноценной нуклеазы Cas9 вместо никазы и второй pegPHK [30]. Отмечена более высокая эффективность PEDAR, но при этом увеличилось и количество нежелательных мутаций, что неудивительно, учитывая возникновение двухцепочечных разрывов. Возможности этого метода продемонстрированы с помощью делеций длиной 991 п.н. и более протяженных, примерно 8 и 10 т.п.н., а также инсерций 44 и 60 п.н.,

несущих сайты узнавания эндонуклеазы I-SceI и рекомбиназы Cre/LoxP соответственно.

Предложен еще один метод парного PE GRAND (genome editing by RTTs partially aligned to each other but nonhomologous to target sequences within duo pegPHK) [52]. В нем также отказались от HA-последовательностей, а для повышения эффективности внесения изменений в редактируемый геном в RTT интегрировали участки, комплементарные друг другу. Такой подход позволил вводить инсерции длиной 150 и 250 п.н. с эффективностью 63 и 28% соответственно. Внедрение вставок длиной свыше 400 п.н. происходило с низкой частотой, тем не менее удалось вставить около 1 т.п.н.

Описано использование нуклеазы Cas9 дикого типа вместе с парными pegPHK, а метод PE на ее основе получил название WT-PE (Wild Type) [53]. Существуют варианты этого метода — C1-WT-PE и C2-WT-PE (Class 1 и Class 2), отличающиеся, соответственно, наличием и отсутствием HA-последовательностей в RTT. Помимо относительно небольших делеций (несколько сотен пар нуклеотидов), с помощью данного метода удалось осуществить межхромом-

сомную транслокацию в клетках человека, размер которой составил около 16.8 млн.п.н.

В 2022 г. основоположники PE описали новый вариант, названный twinPE и ряд его модификаций, одна из которых не содержит НА-последовательности, но образующиеся при этом 3'-Flap у парных никак комплементарны друг другу, что способствует возникновению протяженных делеций. Например, из гена *DMD*, ответственного за возникновение миотонической дистрофии Дюшенна, было удалено 780 п.н. с эффективностью 28% при частоте случайных инделей 5.1%. Метод twinPE позволяет осуществлять не только делеции, но и вставки длиной около 100 п.н. В одной из вставок находились attB- и attP-сайты рекомбиназы *Vxb1*, с помощью которой в геномы затем удалось вставить фрагмент ДНК протяженностью 5.6 т.п.н. с эффективностью, варьирующей от 1.4 до 6.8%. С использованием этих сайтов и рекомбиназы в одностадийном эксперименте осуществили инверсию фрагмента ДНК длиной около 40 т.п.н. с частотой 2% [54].

В дальнейшем эта группа методов PE пополнилась вариантами Bi-PE 2 и 3 (Bi-direction) с парными *regP*НК [55]. В отличие от Bi-PE-2, при Bi-PE-3 в RTT дополнительно внедряли участок НА, длина которого менялась от 8 до 50 нуклеотидов. Однако особой разницы во влиянии длины НА на эффективность делеций не обнаружено. С помощью Bi-PE-3 из гена *HEK3* человека удалили 831 п.н., а также ввели инсерции длиной до 100 п.н., включая вставку парных сайтов системы *Cre/LoxP*, позволяющих затем внедрять протяженные фрагменты ДНК.

Парные *regP*НК использовали еще в одной работе с использованием PE2 [56]. Предложенный подход был назван PETI (Translocation and Inversion), с его помощью наряду с модельным экспериментом, в котором беспромоторный ген зеленого флуоресцентного белка поместили под действующий промотор, в клетках человека получили транслокации и инверсии протяженных участков ряда генов, связанных с онкологическими заболеваниями.

Интересно, что парные *regP*НК, разрезающие противоположные цепи ДНК, использовали для повышения эффективности PE и назвали этот подход Dual *regRNA* strategy [57]. Это исследование заслуживает особого внимания, поскольку его объектом служили растения риса, хотя обычно наука о растениях несколько “отстает” в вопросах применения передовых технологий. Однако в этой работе редактирование генома риса с помощью парных *regP*НК было выполнено с целью введения точечных мутаций, а также получения коротких одно-, двух-

нуклеотидных инделей. При этом эффективность редактирования возросла в 2.9–17.4 раза по сравнению с обычным PE2. При этом соотношение побочных продуктов редактирования было не больше, чем при использовании одной *regP*НК. Эта работа примечательна еще тем, что обстоятельно определяли оптимальную температуру плавления PBS, которая оказалась равной 30°C. Дизайн *regP*НК разрабатывали с использованием специализированной программы *PlantPegDesigner*, которая будет подробно рассмотрена в соответствующем разделе. Следует отметить, что авторы [57] не ставили задачи индуцировать инсерции или делеции протяженных фрагментов ДНК, как в других работах по парному PE.

В целом описанные варианты PE с использованием парных *regP*НК имеют определенные преимущества для создания инделей. В частности, удастся получить более протяженные индели, чем, например, с помощью вариантов PE2 и PE3. Во многом это возможно благодаря двум одноцепочечным разрывам на противоположных цепях ДНК (при использовании Cas-никаз), которые до определенной степени можно приравнять к двухцепочечным разрывам, в значительной степени способствующим процессам рекомбинации.

## ПРОЧИЕ ВАРИАНТЫ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ

Используемая в PE никаза *nCas9* узнает PAM-участок NGG, что может ограничивать ее применение на AT-богатых последовательностях. При этом у разных видов бактерий найдено множество Cas-нуклеаз, распознающих другие виды PAM. Эти никазы весьма широко используются в классических вариантах CRISPR/Cas-редактирования. Помимо природных Cas-нуклеаз созданы их генно-инженерные мутантные формы, узнающие еще более широкий спектр PAM. Однако необходимо признать, что оптимально иметь фермент, не зависящий от PAM-участка, который нацеливается на нужное место редактирования лишь протоспейсерной последовательностью. И работы в этом направлении ведутся [58]. Такими ферментами, почти нетребовательными к наличию PAM-участков, можно считать мутантные Cas-нуклеазы SpG и SpRY, где R = A или G, а Y = C или T. При конструировании SpG-нуклеазы произведено шесть замен аминокислот в Cas9, а для получения второй нуклеазы к этим шести заменам добавили еще пять. Разумеется, не могло не возникнуть идеи воспользоваться ферментами, подобными Cas9, для PE. В одной из работ [59] в данные нуклеазы ввели мутации H840A, чтобы превратить их в никазы. Затем

уже на их основе были разработаны варианты PE, названные PE2-VQR, PE2-VRQR (с PAM участками NGA), PE2-VRER (PAM – NGCG), PE2-NG, PE2-SpG, PE2-SpRY, позволившие получить более 50 мутаций в клетках HEK293T человека. Недавно для PE успешно использовали нуклеазу FnCas9 из бактерии *Francisella novicida*, узнающую традиционную PAM-последовательность NGG – в нуклеазу FnCas9 внесли мутацию H969A и получили из нее никазу [60]. Ранее никазу nSaCas9 (N580A) применили в PE ряда генов риса, однако надежд на улучшение процесса внесения изменений она не оправдала [61].

Что касается альтернативы обратной транскриптазе M-MLV, то сообщается об испытании девяти подобных ретровирусных ферментов, из которых лишь фермент XMRV (xenotropic murine-leukemia-virus-related virus) показал некоторую пригодность для PE, приблизительно в 3 раза уступив пентамутанту M-MLV [46]. Однако ниже будет рассмотрено более кардинальное решение применения в PE обратной транскриптазы как индивидуального фермента, не сшитого с Cas.

Так, стало известно о возможности использования в PE несшитых никазы nCas9 и обратной транскриптазы M-MLV, что позволило задействовать два аденовирусных вектора, один из которых нес ген никазы nCas9, а второй – ген обратной транскриптазы вместе с участками, кодирующими regPНК и ngPНК [41]. Этот подход получил название разделенного PE (split-PE, sPE). Гидродинамическая инъекция этих компонентов в клетки печени мышей позволила получить намеченные мутации с сопоставимым числом нецелевых мутаций, характерным для варианта PE3 [41].

Описано разделение никазы nCas9 и обратной транскриптазы M-MLV, причем обратная транскриптаза была укорочена почти на треть и потеряла PНКазную (PНКазы H) активность [62]. Эффективность PE клеток человека с помощью PE2 и split-PE2 была сопоставимой.

Еще до начала использования несшитых ферментов nCas9 и M-MLV в ряде работ применили временное разделение этих ферментов с их последующим восстановлением с помощью интеиновых систем. Такие манипуляции были направлены главным образом на облегчение доставки к месту редактирования необходимых компонентов, в том числе с помощью аденовирусного вектора, емкость которого ограничена 4.8 т.п.н., тогда как химерный ферментативный комплекс имеет заметно больший размер. Так, на основе интеина *Rhodothermus marinus* сконструированы четыре варианта разделения этих

ферментов, один из которых оказался наиболее удачным. С его помощью проведено PE путем плазмидной трансфекции клеток человека методом электропорации и инъекции этих клеток в сетчатку глаза мышей *in vivo* [63]. Метод называли dual-AAV split-PE. Предложен также вариант PE с временным разделением химерного фермента и его дальнейшим восстановлением, но с использованием интеиновой системы *Nostoc punctiforme* [27]. Несколько позже, также с помощью интеиновой системы *N. punctiforme*, nCas9 и M-MLV разделили, затем доставили к месту редактирования и повторно объединили. У M-MLV при этом был удален домен размером около 0.6 т.п.н., кодирующий PНКазу H, что несколько уменьшило размер обратной транскриптазы. Химерный фермент, названный PE2<sup>ΔRnH</sup> [64], успешно использовали для PE генома клеток печени мыши путем инъекции плазмидных конструкций в вену в условиях *in vivo*.

Улучшить PE можно, встраивая ДНК-связывающий домен через линкеры из 16 и 33 аминокислот между никазой Cas9 и обратной транскриптазой M-MLV [65]. Этот подход назван hyperPE2, сокращенно huPE2. Однако при PE генома риса этот подход, названный phyPE2 (plant), неожиданно оказался менее эффективным, чем стандартный PE2.

Улучшить эффективность PE попытались, добавив на N-конец химерного белка nCas9/M-MLV пептид из 85 аминокислотных остатков [66]. С этой целью создана библиотека из 12000 пептидов, из которых выбрали наиболее перспективные, способствующие повышению эффективности трансляции в клетке. В соответствии с обозначением одного из двух наиболее подходящих пептидов такой вариант PE назван IN-PE2.

Обнаружено, что некоторые химические ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi – Histone Deacetylase inhibitors) повышают эффективность получения инделей методом PE, но не однонуклеотидных замен [67]. Показано [68], что применение хроматин-модулирующих пептидов (CMP – Chromatin-modulating peptides) улучшает доступность места редактирования, что легло в основу подходов CMP-PE-V1 и CMP-PE-V2, отличающихся локализацией нуклеосомных доменов HN1 и H1G в составе слитого химерного белка. В этой же работе предпринята попытка сделать хроматин более доступным, связав с участком ДНК недалеко от места PE так называемую dsPНК (dead), не приводящую к возникновению разрывов цепей из-за ее особой структуры, как это показано ранее [69]. Здесь можно также заметить, что подобного эффекта большей доступности

ДНК удалось добиться с помощью каталитически неактивной нуклеазы dCas9, расплетающей цепи ДНК неподалеку от целевого сайта при условии использования для него другой нуклеазы Cas, не конкурирующей за dsgРНК [70]. Теоретически это можно применить и для РЕ, причем со значительным эффектом.

Для РЕ гена супероксиддисмутазы в культуре клеток человека предложено использовать транспозонную систему piggyBac, позволяющую удалять сделавшую свое дело конструкцию. Такой подход получил название РВ-РЕ (piggyBac) [71]. Можно отметить, что этот транспозон уже использовали в CRISPR/Cas9-редактировании генома риса для доставки трансгенов [72]. Можно предположить, что РВ-РЕ найдет применение в РЕ растительных объектов.

Практически все вышеописанные методы предполагали доставку компонентов к местам редактирования с помощью генно-инженерных конструкций как встраиваемых в геномы редактируемых объектов, так и экспрессирующихся транзитивно. Иной подход заключается в доставке тем или иным способом в ядро клетки готовых РНП, формируемых *in vitro* из гидовых РНК и подходящих Cas-нуклеаз. Подход имеет определенные преимущества, чему ранее мы уделили значительное внимание при рассмотрении классического CRISPR/Cas-редактирования растительных объектов [73, 74]. Что касается прайм-редактирования с использованием готовых РНП, то такие варианты для растений пока не описаны, имеются лишь единичные публикации, в которых сообщается о применении этой технологии. Так, в эксперименте на эмбрионах полосатого данио *Danio rerio* сформированный и доставленный к месту РЕ РНП, содержащий в составе химерного фермента обратную транскриптазу, позволил успешно индуцировать делеции (5 и 10 п.н.) и инсерции (от 3 до 18 п.н.) с эффективностью более 33 и 18% соответственно [75]. В этой же статье при работе с культурой клеток человека G заменили на C, получили инсерцию 3 п.н. и делецию 5 п.н. с эффективностью около 6, 15 и 21% соответственно. При этом отмечено возникновение нецелевых мутаций при использовании вариантов РЕ2 и РЕ3. Необходимо отметить, что в этих экспериментах 5'- и 3'-концы regРНК и ngРНК несли стабилизирующие модификации. Еще в одной работе [41], описывающей РЕ в варианте sРЕ с отдельными никазой nCas9 и обратной транскриптазой M-MLV, компоненты редактирования (РНП или соответствующих мРНК) в клетки человека доставляли с помощью электропорации. Были опробованы несколько вариантов: использовали мРНК никазы nCas9 и обратной транскриптазы M-MLV (sРЕ), а также единую мРНК химерного фермента (РЕ2) вместе с regРНК и ngРНК.

В случае доставки РНП обратная транскриптаза не входила в его состав, а котрансфицировалась в виде отдельного белка, несущего NLS данного фермента. При этом эффективность внесения целевых мутаций этими способами различалась незначительно при сопоставимом проценте нецелевых инделей.

Из-за относительно низкой эффективности РЕ в целом этот метод, несмотря на его потенциал, пока не имеет широкого распространения. При этом стоит задача повысить успешность редактирования, в том числе путем обогащения пула клеток, в которых произошло целевое РЕ. Так, предложено использовать редактирование модельного гена, которое будет приводить к изменению фенотипа. В такой ген намеренно вносятся мутации, которые будут исправлены при успешном редактировании. В качестве репортерного гена использовали расположенный на плазмиде транзитивно экспрессирующийся дефектный *GFP*, который восстанавливали введением обратных мутаций с помощью РЕ [76]. Клетки, в которых ожидалась более высокая вероятность целевого РЕ, отбирали по интенсивности флуоресценции *GFP*. Авторы назвали свой метод PEAR (Prime Editor Activity Reporter). Несколько отличающийся способ обогащения отредактированных последовательностей получил название fluoPEER (fluorescent Prime Editing Enrichment Reporter) [77]. В способе fluoPEER между генами двух флуоресцентных белков *GFP* и mCherry на плазмиде располагался фрагмент геномной ДНК длиной 45–100 п.н., который требовалось отредактировать. При успешном редактировании возникало свечение второго белка mCherry, что свидетельствовало о нужном изменении клонированного участка, а значит, и в самой геномной ДНК возникла, вероятно, аналогичная целевая мутация. Сортировка клеток с помощью проточной цитофлуориметрии выявила трехкратное обогащение отредактированными клетками. Суррогатным модельным маркером служил ген  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, обеспечивающей устойчивость к сердечному гликозиду убаину [78]. Редактирование подобных плазмид позволяет достаточно быстро оценить эффективность новых модификаций системы РЕ-CRISPR и перспективы их использования в редактировании геномной ДНК.

В некоторых работах метод РЕ использовали с иными целями, нежели улучшение характеристик организма. Так, с помощью РЕ в геном культуры клеток человека вставляли короткие участки ДНК с случайными последовательностями [79]. С этой целью конструировали regРНК, несущие PBS длиной 13 нуклеотидов, далее следовал участок RTT с НА-последовательностью из 10 нуклеотидов, между которыми помещалась случайная последовательность из 5 (10)



нуклеотидов, образующая множество комбинаций перестановок азотистых оснований ( $4^5$  или  $4^{10}$ ), которые в итоге внедрялись в разные места генома. Этот метод, получивший название Random-PE, может использоваться в разных целях, в частности для баркодирования.

Предложен также метод регистрации событий, последовательно происходящих в геноме, получивший название DNA Typewriter. Он заключается в записи на некой условной ленте ДНК (DNA Tape) тандемно расположенных спейсеров, из которых активен только первый, а остальные укорочены, но активируются поочередно после внедрения предыдущего, что приводит к возникновению PAM-участка NGG [80].

### КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ

Существует большое количество программ дизайна гидовых РНК для разных вариантов геномного редактирования CRISPR/Cas [19–21], тогда как для регРНК таких программ значительно меньше. Их описание следует начать с web-приложения PE-Designer (<http://www.rgenome.net/pe-designer/>) [81], которое входит в большой пакет прикладных программ CRISPR GEN Tools (<http://www.rgenome.net/>). Для выбора подходящих мест редактирования в референсной последовательности длиной до 1000 п.н. предлагается выбрать тип никазы, включая мутантные формы из довольно большого перечня (SpCas9, VREr SpCas9, VQR SpCas9, SpRY Cas9, NG-Cas9 или xCas9 3.7, iSpyMac Cas9, SpRY Cas9, SpRY Cas9), которые различаются узнаваемыми PAM-участками. Необходимо ввести в соответствующее окно ожидаемую после PE последовательность, также длиной до 1000 п.н. Требуется выбрать геном из большого списка, подразделенного на следующие группы – Vertebrates, Non-reference Vertebrates, Insects, Plants, Others. Для выбора доступно более 200 видов растений, приведенных не в алфавитном порядке. Впрочем, есть возможность добавить отсутствующий геном, отправив соответствующий запрос разработчикам программы. После этого остается указать длину спейсерной последовательности в диапазоне от 5 до 25 нуклеотидов и запустить процесс поиска. На web-странице PE-Designer со ссылкой на публикацию Anzalone и соавт. [4] присутствует напоминание обо всех возможных 12 транзициях и трансверсиях, а также инсерциях и делециях длиной до 44 и 80 нуклеотидов, которые могут образоваться в результате PE. По завершении поиска программа выдает таблицу с перечнем предлагаемых вариантов. При выборе одного из вариантов появляется фрагмент нуклеотидной

последовательности целевого участка с рекомендуемыми регРНК, выделенными красным цветом, тогда как возможные нгРНК отображаются синим цветом. Сопровождает эту программу еще одна – PE-Analyzer, служащая для анализа данных NGS на предмет выявления нецелевых мутаций, но о ней речь пойдет дальше.

Иной подход к подбору регРНК предложен в web-приложении<sup>1</sup> pegFinder (<http://pegfinder.sidichenlab.org/>) [82]. Программа может работать с последовательностями длиной до 500 нуклеотидов, из которых исходная ДНК занимает лишь 300, поскольку рекомендуется по краям целевого участка включать по 100 фланкирующих нуклеотидов. Аналогичные рекомендации действуют и при вводе желаемого результата редактирования. Далее предлагается выбрать, будет ли это вариант PE3/PE3b, и указать места расположения нгРНК на расстоянии 40–150 нуклеотидов от предполагаемого участка редактирования. Затем необходимо выбрать основной фермент из трех возможных – Cas9-NGG, Cas9-NG, Cas9-SpRY. Разрешается опционально в отдельное окно вводить гидовую РНК, заранее подобранную с помощью подходящих программ дизайна [19–21]. Имеются у pegFinder и другие опции. В итоге генерируется таблица с подобранными регРНК и sgРНК, а также соответствующими олигонуклеотидами для клонирования.

Еще одна программа дизайна регРНК – PrimeDesign [83]. Эту программу можно как установить на компьютер пользователя (<https://github.com/pinellolab/PrimeDesign>), так и использовать в качестве web-приложения (<https://drugthatgene.pinellolab.partners.org/>). Сначала требуется ввести исходную последовательность с одновременным указанием планируемых изменений в виде замен нуклеотидов, инсерций и делеций в любой комбинации. Далее указывают длины участков PBS и RTT и расстояние до мест расщепления, вызываемых регРНК и нгРНК (до 100 нуклеотидов между ними). Имеется еще ряд параметров, которые может задавать экспериментатор. После завершения подбора формируется таблица с рекомендуемыми последовательностями гидовых РНК и информацией о том, сохраняется ли после редактирования PAM-участок. На сайте представлена короткая версия, демонстрирующая весь ход дизайна.

Web-ресурс pegIT (<https://pegit.giehmlab.dk/>) [84] для дизайна регРНК требует сначала выбрать тот или иной геном из небольшого списка, в котором есть три растения (рис, мягкая пше-

<sup>1</sup> pegFinder также выложена на сайте <https://github.com/rdchow/pegfinder>

ница и кукуруза), после чего в другом окне появляется возможность указать название гена или его идентификационный номер. Затем можно выбрать подходящую нишу из перечня (SpCas9, CjCas9, SaCas9, SaCas9KKH, SpCas9NG). Предлагается еще несколько доступных опций для дизайна *peg*РНК, по результатам которого выдается файл с нуклеотидной последовательностью и указанием ожидаемых изменений.

Довольно широкие возможности дизайна *peg*РНК вместе с *ng*РНК предоставляет программа PnB Designer, доступная как для установки на компьютер пользователя (<https://github.com/SebastianSiegner/PnB-Designer>), так и в виде *web*-приложения (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) [85]. PnB Designer позволяет выбрать геном из нескольких представленных на сайте (человек, мышь, *D. rerio*, рис, *A. thaliana*, виноград) или использовать вариант 'None of the above'. Далее требуется выбрать тип поиска (для одного образца или для множественных), после чего ввести редактируемую последовательность(и) или геномные координаты и указать тип намечаемых изменений (замена, инсерция, делеция). Необходимо указать длины участков PBS и RTT. Поиск подходящих гидовых РНК ведется по обоим цепям ДНК. При выдаче результатов программа рассчитывает в том числе значение '*peg*RNA score', показывающее степень надежности и эффективности внесения желаемых мутаций. Однако разработчики указывают, что относиться к этому показателю нужно с осторожностью.

Единственная программа, ориентированная непосредственно на дизайн *peg*РНК для РЕ растительных объектов, — PlantPegDesigner version 1.0, реализованная в виде *web*-ресурса (<http://www.plantgenomeediting.net/>), а также доступная для установки на компьютер пользователя (<https://github.com/JinShuai001/PlantPegDesigner>) [57]. Для дизайна *peg*РНК необходимо ввести через буфер обмена нуклеотидную последовательность, в которой намечаемые изменения указывают в круглых скобках по типу (G/A), (-/T), (CGAT/-) для замен, инсерций и делеций соответственно. Причем по краям целевой последовательности рекомендуется добавлять по 50 фланкирующих нуклеотидов. Также можно загрузить *fasta*-файл с нужной последовательностью. Далее необходимо определиться с РАМ-участком (NGG, NG или другой вариант), выбрать длину спейсера и его GC-состав, а также характеристики PBS и RTT. Главное отличие PlantPegDesigner от подобных программ состоит в возможности выбора одиночной или парных *peg*РНК. В заключение необходимо выбрать подходящий вектор из предназначенных для агробактериальной трансформации, или для трансформации протопластов, или для

бомбардировки золотыми частицами. В зависимости от выбранного вектора программой будут сгенерированы олигонуклеотидные последовательности для клонирования. При этом PlantPegDesigner позволяет вести одновременно дизайн до 50 *peg*РНК, а по согласованию с разработчиками — даже большего количества. Программа выдает результат в виде таблицы, содержащей информацию о подобранном спейсере, PBS, RTT, включая их GC-состав, температуры, рекомендуемые для РЕ, а также последовательности для клонирования.

Существует еще целый ряд программ, позволяющих осуществлять дизайн *peg*РНК, характеризующихся меньшим функционалом или не имеющих *web*-приложений. Среди них Easy-Prime (<http://easy-prime.cc/>) [86], DeepPE (<http://deepcrispr.info/DeepPE/>), PETAL (<https://gt-scan.csiro.au/petal/submit>) [29], Prime Editing Design Tool (<https://primeedit.nygenome.org/>), Prime-Del (<https://primedel.uc.r.appspot.com/>), multicrispr [87], PINE-CONE (<https://github.com/xiaowanglab/PINE-CONE>) [88], PRIDICT (<https://pridict.it>) [89].

Поскольку *peg*РНК несет на 3'-конце дополнительный участок, который не должен формировать нежелательную вторичную структуру с остальной частью РНК, необходимо проводить дополнительный скрининг подобранных PBS и RTT. Для этого разработана компьютерная программа *peg*LIT (<https://peglit.liugroup.us/>), с помощью которой можно подбирать подходящие дополнительные последовательности, исключающие их интерференцию с *peg*РНК [33].

Крайне важно после завершения редактирования убедиться в том, что целевые изменения внесены, а нецелевые не возникли. Для этого применяется полногеномное секвенирование вместе со специальными программами, одна из которых упомянута выше — PE-Analyzer (<http://www.rgenome.net/pe-analyzer/>) [81]. *Web*-приложение этой программы позволяет вводить данные секвенирования, выбрав его тип, в виде файлов *fastq* или *gzipped fastq*, референсную последовательность, последовательность спейсера *peg*РНК, информацию о намечавшихся мутациях и ряд других параметров. Результаты классифицируются как исходные последовательности, замены, инсерции и делеции и выдаются в виде таблицы. С этой целью создана также программа TAPE-seq (TAgmentation of Prime Editor sequencing) [90], доступная для установки на компьютер пользователя с ресурса *github* ([https://github.com/PhyzenInc/TAPE-seq\\_flanking\\_depth](https://github.com/PhyzenInc/TAPE-seq_flanking_depth)).

## ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

При описании различных вариантов PE выше упомянуты отдельные результаты, полученные при редактировании геномов растений, и необходимо их некоторое обобщение. Однако с учетом обзорной статьи [8] по PE геномов четырех видов растений (рис, пшеница, кукуруза, томат), в которой проведен подробный анализ используемых на тот момент технологий трансформации, типа мутаций, эффективности их получения и сопутствующей информации, стоит остановиться лишь на самых последних данных. В большинстве работ по PE генов растений объектом служит рис, эта тенденция сохраняется, но при этом расширяется спектр мишеней для редактирования. Так, в одной работе [91] мишенью в геноме риса был ген *waxy*, ответственный за биосинтез амилозы. В этой работе, ставящей целью определить преимущества того или иного варианта PE, лучшими оказались PE2 и PE3: при использовании на одинаковых мишенях вариант PE2 заметно превосходил PE3 — до 67% точного редактирования против 17%. Впрочем, подобный эффект характерен и для многих ранее проведенных экспериментов.

С применением методов PE3max и PE5max и соответствующих *regPНК* в ген *EPSPS* (5-енолпирувоилшикимат-3-фосфатсинтаза) риса (протопласты) были внесены мутации T173I, A174V и R177S, обеспечивающие устойчивость растений к глифосату [92], а также получены растения кукурузы с устойчивостью к глифосату, а также к другим гербицидам, обусловленной мутациями в генах ацетолактатсинтазы (ALS) и ацетил-CoA-карбоксилазы (ACCase) [93]. С помощью варианта ePPE PE созданы мутантные растения риса, устойчивые к гербицидам (сульфонилмочевине и имидазолину) [44]. Кроме того, в этой же работе в растениях риса с трансгеном *GFP* заменили кодон SAC (His) на TAC (Tyr) в положении 66, что привело к конверсии зеленого белка GFP в голубой (BFP) [44].

С помощью варианта PPE PE внесли изменения в геномы табака *Nicotiana benthamiana*, риса и *A. thaliana*. Мишени выбирали с таким расчетом, чтобы последствия подобного редактирования были видны невооруженным глазом [94]. Еще большее число видов растений — рис, нут, арахис и коровий горох — использовали в модельных экспериментах по восстановлению мутантного *GFP* в протопластах с помощью парного PE, что, по-видимому, служит шагом к применению этого метода в селекционных программах для бобовых [95].

При PE такого модельного объекта, как мох *Physcomitrium patens* [96], в качестве мишени

был выбран ген аденин-фосфорибозилтрансферазы, превращающей аденин в аденозинмонофосфат (АМР) и способный конвертировать 2-фтораденин в токсичное для мха соединение 2-фтор-АМР. Токсическое действие этого гена можно предотвратить введением терминирующего кодона TGA вместо кодона в положении 100 (AGG). В этой же работе модификация гена ацетолактатсинтазы придавала картофелю устойчивость к гербициду хлорсульфону. Причем в обоих случаях вариант PE2 оказался лучше, чем PE3, что в целом можно считать характерным для растительных объектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пожалуй, ни для одного метода молекулярной биологии, кроме разве что ПЦР, за столь короткое время не предложено такого же многообразия вариаций, как для PE. Одно перечисление аббревиатур названий модификаций метода с расшифровкой может занять несколько строк. Главной причиной этому служит потенциальная возможность высокоточного внесения разноплановых изменений в геномы различных организмов, включая растения. Несомненным преимуществом PE является низкая частота нецелевых мутаций, к сожалению, частично нивелируемая невысокой эффективностью данного процесса, что заставляет совершенствовать метод.

Эффективность PE во многом зависит как от редактируемого организма, так и от выбранной мишени. Хотя *regPНК* можно конструировать с помощью компьютерных программ, рассчитанных на дизайн *sgPНК*, важное значение имеют специализированные web-ресурсы и программы PE. Они предназначены для целенаправленного подбора *regPНК* с учетом данных о полных геномах многих видов растений, животных, человека и других организмов и позволяют улучшить процесс редактирования, максимально обходясь без нецелевых мутаций. *RegPНК* имеет такое важное отличие от *sgPНК*, как удлиненный 3'-конец, не защищенный молекулой Cas9-никазы (нуклеазы), поэтому целый ряд работ направлен на то, чтобы исключить разрушение этого конца *regPНК*. РНКазы с использованием дополнительных последовательностей и мутаций в константных частях *regPНК*, упрочняющих вторичную структуру этих молекул, вплоть до их циклизации и превращения в так называемую *retPНК*.

Серьезным недостатком PE является возможное восстановление отредактированных последовательностей. Чтобы снизить эту вероятность, предложено использовать белки, ингибирующие процессы репарации в живой клетке.

Эффективность введения целевых мутаций была повышена благодаря использованию дополнительных Cas9-никаз, делающих другие разрывы на той же цепи, в том числе в области уже отредактированной последовательности. Также практиковалось введение двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных действием полноценных Cas9-нуклеаз с двумя функциональными доменами.

Цели повышения эффективности внесения целевых мутаций служит также парное PE, для которого предложено несколько отличающихся вариантов. Для увеличения количества доступных протоспейсеров помимо классической SpCas9-никазы предложено использовать как ее мутанты, так и аналоги из других микроорганизмов, узнающие иные PAM-участки.

Что касается еще одного компонента PE, а именно обратной транскриптазы M-MLV, то в большинстве работ используется пентамутант этого фермента. В него вводили и дополнительные мутации, в том числе с целью оптимизации кодонов для лучшей трансляции в конкретных организмах. Помимо этого, из M-MLV удаляли активность РНКазы Н, что, с одной стороны, позволяло не опасаться разрушения цепей РНК в гетеродуплексах, а с другой — обеспечивало заметное укорочение данного белка, что облегчало его доставку к месту редактирования. Наконец, описано использование отдельной доставки Cas9-никазы и обратной транскриптазы M-MLV и их соединения в клетке в единое целое с помощью интеино-вых систем, что заметно упрощало их доставку. В PE используются также РНП-комплексы и отдельные молекулы мРНК.

Для лучшей локализации в клеточном ядре Cas9-никазы и обратной транскриптазы предложено использовать дополнительные NLS.

Можно надеяться, что дальнейшее развитие технологий PE, в том числе направленных на получение целевых инделей увеличенного размера, позволит настолько улучшить метод, что со временем он займет достойное место в арсенале методов направленного воздействия на геномы любых организмов и окажет положительное влияние на такие сферы человеческой деятельности, как аграрный сектор, промышленные биотехнологии, где те или иные живые организмы играют ключевую роль. При этом нельзя не отметить, что помимо PE и классического редактирования с одной полноценной нуклеазой, а также редактирования отдельных азотистых оснований, разрабатываются и иные подходы к внесению целевых изменений в геномы разных организмов. Например, неплохой потенциал имеет использование программиру-

емых нуклеаз из семейства прокариотических белков-аргонавтов [97].

Исследование Михайловой Е.В., Кулуева Б.Р. поддержано грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.), работа Геращенко Г.А., Кулуева А.Р., Баймиева Ан.Х., Баймиева Ал.Х., Чемериса А.В. выполнена в рамках государственных заданий № 122041400162-3 и № 122030200143-8.

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. Shen H., Strunks G.D., Klemann B.J., Hooykaas P.J., de Pater S. (2017) CRISPR/Cas9-induced double-strand break repair in Arabidopsis nonhomologous end-joining mutants. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 7(1), 193–202.
2. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) Эволюция методов редактирования геномов. *Biomics*. 9(3), 245–270.
3. Злобин Н.Е., Лебедева М.В., Таранов В.В., Харченко П.Н., Бабаков А.В. (2018) Редактирование генома растений путем направленной замены азотистых оснований (обзор). *Биотехнология*. 34(6), 59–68.
4. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 576(7785), 149–157.
5. Wang J.Y., Doudna J.A. (2023) CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*. 379(6629), eadd8643.
6. Abdullah, Jiang Z., Hong X., Zhang S., Yao R., Xiao Y. (2020) CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants. *Synthetic Systems Biotechnol.* 5(4), 277–292.
7. Anzalone A.V., Koblan L.W., Liu D.R. (2020) Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.* 38(7), 824–844.
8. Hao L., Pu X., Song J. (2021) Introduction of mutations in plants with prime editing. *Methods*. 194, 83–93.
9. Hassan M.M., Zhang Y., Yuan G., De K., Chen J.-G., Muchero W., Tuskan G.A., Qi Y., Yang X. (2021) Construct design for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Trends Plant Sci.* 26(11), 1133–1152.

10. Hassan M.M., Yuan G., Liu Y., Alam M., Eckert C.A., Tuskan G.A., Golz J.F., Yang X. (2022) Precision genome editing in plants using gene targeting and prime editing: existing and emerging strategies. *Biotechnol. J.* **17**(10), 2100673.
11. Molla K.A., Sretenovic S., Bansal K.C., Qi Y. (2021) Precise plant genome editing using base editors and prime editors. *Nat. Plants.* **7**(9), 1166–1187.
12. Ochoa-Sanchez A., Perez-Sanchez G., Torres-Ledesma A.M., Valdez J.P.R., Rinaldi G., Moguel B.B., Molina-Aguilar C. (2021) Prime editing, a novel genome-editing tool that may surpass conventional CRISPR-Cas9. *Re:GEN Open.* **1**(1), 75–82. <https://doi.org/10.1089/regen.2021.0016>
13. Chen P.J., Liu D.R. (2023) Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nat. Rev. Genet.* **24**(3), 161–177.
14. Hillary V.E., Ceasar S.A. (2022) Prime editing in plants and mammalian cells: mechanism, achievements, limitations, and future prospects. *BioEssays.* **44**(9), 2200032.
15. Li J., Zhang C., He Y., Li S., Yan L., Li Y., Zhu Z., Xia L. (2023) Plant base editing and prime editing: the current status and future perspectives. *J. Integr. Plant. Biol.* **65**(2), 444–467. doi: 10.1111/jipb.13425
16. Lu C., Kuang J., Shao T., Xie S., Li M., Zhu L., Zhu L. (2022) Prime editing: an all-rounder for genome editing. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(17), 9862.
17. Doman J.L., Sousa A.A., Randolph P.B., Chen P.J., Liu D.R. (2022) Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells. *Nat. Protoc.* **17**(11), 2431–2468.
18. Jin S., Lin Q., Gao Q., Gao C. (2022) Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs). *Nat. Protoc.* **18**(3), 831–853.
19. Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Губайдуллин М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2020) Дизайн РНК-гидов для CRISPR/Cas редактирования геномов растений. *Молекуляр. биология.* **54**(1), 29–50.
20. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. (2018) Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sci.* **10**, 455–465.
21. Li C., Chu W., Gill R.A., Sang S., Shi Y., Hu X., Yang Y., Zaman Q.U., Zhang B. (2023) Computational tools and resources for CRISPR/Cas genome editing. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **21**(1), 108–126.
22. Lin Q., Zong Y., Xue C., Wang S., Jin S., Zhu Z., Wang Y., Anzalone A.V., Raguram A., Doman J.L., Liu D.R., Gao C. (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.* **38**(5), 582–585.
23. Butt H., Rao G.S., Sedeek K., Aman R., Kamel R., Mahfouz M. (2020) Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotechnol. J.* **18**(12), 2370–2372.
24. Li H., Li J., Chen J., Yan L., Xia L. (2020) Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol. Plant.* **13**(5), 671–674.
25. Tang X., Sretenovic S., Ren Q., Jia X., Li M., Fan T., Yin D., Xiang S., Guo Y., Liu L., Zheng X., Qi Y., Zhang Y. (2020) Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol. Plant.* **13**(5), 667–670.
26. Chen P.J., Hussmann J.A., Yan J., Knipping F., Ravisankar P., Chen P.-F., Chen C., Nelson J.W., Newby G.A., Sahin M., Osborn M.J., Weissman J.S., Adamson B., Liu D.R. (2021) Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell.* **184**(22), 5635–5652.e29.
27. Liu P., Liang S.-Q., Zheng C., Mintzer E., Zhao Y.G., Ponniselvan K., Mir A., Sontheimer E.J., Gao G., Flotte T.R., Wolfe S.A., Xue W. (2021) Improved prime editors enable pathogenic allele correction and cancer modelling in adult mice. *Nat. Commun.* **12**(1), 2121.
28. Ferreira da Silva J., Oliveira G.P., Arasa-Verge E.A., Kagiou C., Moreton A., Timelhale G., Jiricny J., Loizou J.I. (2022) Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. *Nat. Commun.* **13**(1), 760.
29. Adikusuma F., Lushington C., Arudkumar J., Godahewa G.I., Chey Y.C.J., Gierus L., Piltz S., Geiger A., Jain Y., Reti D., Wilson L.O.W., Bauer D.C., Thomas P.Q. (2021) Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells. *Nucl. Acids Res.* **49**(18), 10785–10795.
30. Jiang T., Zhang X.-O., Weng Z., Xue W. (2022) Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 227–234.
31. Peterka M., Akrap N., Li S., Wimberger S., Hsieh P.-P., Degtev D., Bestas B., Barr J., van de Plassche S., Mendoza-Garcia P., Šviković S., Sienski G., Firth M., Maresca M. (2022) Harnessing DSB repair to promote efficient homology-dependent and -independent prime editing. *Nat. Commun.* **13**(1), 1240.
32. Li X., Zhang G., Huang S., Liu Y., Tang J., Zhong M., Wang X., Sun W., Yao Y., Ji Q., Wang X., Liu J., Zhu S., Huang X. (2023) Development of a versatile nuclease prime editor with upgraded precision. *Nat. Commun.* **14**(1), 305.
33. Nelson J.W., Randolph P.B., Shen S.P., Everette K.A., Chen P.J., Anzalone A.V., An M., Newby G.A., Chen J.C., Hsu A., Liu D.R. (2022) Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* **40**(3), 402–410.
34. Zou J., Meng X., Liu Q., Shang M., Wang K., Li J., Yu H., Wang C. (2022) Improving the efficiency of prime editing with epegRNAs and high-temperature treatment in rice. *Sci. China Life Sci.* **65**(11), 2328–2331.
35. Zhang G., Liu Y., Huang S., Qu S., Cheng D., Yao Y., Ji Q., Wang X., Huang X., Liu J. (2022) Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA. *Nat. Commun.* **13**(1), 1856.
36. Chai Y., Jiang Y., Wang J., Qiao D., Zhang Y., Xin C., Zhou Y., Wang X.-C., Chen Q.-J. (2021) MS2

- RNA aptamer enhances prime editing in rice. *bioRxiv*. 2021-10. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.20.465209v1.full.pdf>
37. Chen R., Cao Y., Liu Y., Zhao D., Li J., Cheng Z., Bi C., Zhang X. (2023) Enhancement of a prime editing system via optimal recruitment of the pioneer transcription factor P65. *Nat. Commun.* **14**(1), 257.
  38. Li X., Zhou L., Gao B.-Q., Li G., Wang X., Wang Y., Chen J. (2022) Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure. *Nat. Commun.* **13**(1), 1669.
  39. Li X., Wang X., Sun W., Huang S., Zhong M., Yao Y., Ji Q., Huang X. (2022) Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes. *J. Mol. Cell. Biol.* **14**(4), mjac022.
  40. Liu Y., Yang G., Huang S., Li X., Wang X., Li G., Chi T., Chen Y., Huang X., Wang X. (2021) Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA. *Cell Res.* **31**(10), 1134–1136.
  41. Liu B., Dong X., Cheng H., Zheng C., Chen Z., Rodríguez T.C., Liang S.-Q., Xue W., Sontheimer E.J. (2022) A split prime editor with untethered reverse transcriptase and circular RNA template. *Nat. Biotechnol.* **40**(9), 1388–1393.
  42. Huang S., Zhang Z., Tao W., Liu Y., Li X., Wang X., Harati J., Wang P.-Y., Huang X., Lin C.-P. (2022) Broadening prime editing toolkits using RNA-Pol-II-driven engineered pegRNA. *Mol. Ther.* **30**(9), 2923–2932.
  43. Xu R., Li J., Liu X., Shan T., Qin R., Wei P. (2020) Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun.* **1**(3), 100043.
  44. Zong Y., Liu Y., Xue C., Li B., Li X., Wang Y., Li J., Liu G., Huang X., Cao X., Gao C. (2022) An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nat. Biotechnol.* **40**(9), 1394–1402.
  45. Zheng C., Liang S.Q., Liu B., Liu P., Kwan S.Y., Wolfe S.A., Xue W.A. (2022) Flexible split prime editor using truncated reverse transcriptase improves dual-AAV delivery in mouse liver. *Mol. Ther.* **30**(3), 1343–1351.
  46. Gao Z., Ravendran S., Mikkelsen N.S., Haldrup J., Cai H., Ding X., Paludan S.R., Thomsen M.K., Mikkelsen J.G., Bak R.O. (2022) A truncated reverse transcriptase enhances prime editing by split AAV vectors. *Mol. Ther.* **30**(9), 2942–2951.
  47. Xu W., Yang Y., Yang B., Krueger C.J., Xiao Q., Zhao S., Zhang L., Kang G., Wang F., Yi H., Ren W., Li L., He X., Zhang C., Zhang B., Zhao J., Yang J. (2022) A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants. *Nat. Plants.* **8**(1), 45–52.
  48. Li J., Chen L., Liang J., Xu R., Jiang Y., Li Y., Ding J., Li M., Qin R., Wei P. (2022) Development of a highly efficient prime editor 2 system in plants. *Genome Biol.* **23**(1), 161.
  49. Jiang Z., Abdullah, Zhang S., Jiang Y., Liu R., Xiao Y. (2022) Development and optimization of CRISPR prime editing system in photoautotrophic cells. *Molecules.* **27**(6), 1758.
  50. Zhuang Y., Liu J., Wu H., Zhu Q., Yan Y., Meng H., Chen P.R., Yi C. (2022) Increasing the efficiency and precision of prime editing with guide RNA pairs. *Nat. Chem. Biol.* **18**(1), 29–37.
  51. Choi J., Chen W., Suiter C.C., Lee C., Chardon F.M., Yang W., Leith A., Daza R.M., Martin B., Shendure J. (2022) Precise genomic deletions using paired prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 218–226.
  52. Wang J., He Z., Wang G., Zhang R., Duan J., Gao P., Lei X., Qiu H., Zhang C., Zhang Y., Yin H. (2022) Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors. *Nat. Methods.* **19**(3), 331–340.
  53. Tao R., Wang Y., Hu Y., Jiao Y., Zhou L., Jiang L., Li L., He X., Li M., Yu Y., Chen Q., Yao S. (2022) WT-PE: prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing. *Sig. Transduct. Target Ther.* **7**(1), 108.
  54. Anzalone A.V., Gao X.D., Podracky C.J., Nelson A.T., Koblan L.W., Raguram A., Levy J.M., Mercer J.A.M., Liu D.R. (2022) Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(5), 731–740.
  55. Tao R., Wang Y., Jiao Y., Hu Y., Li L., Jiang L., Zhou L., Qu J., Chen Q., Yao S. (2022) Bi-PE: bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **50**(11), 6423–6434.
  56. Kweon J., Hwang H.-Y., Ryu H., Jang A.-H., Kim D., Kim Y. (2023) Targeted genomic translocations and inversions generated using a paired prime editing strategy. *Mol. Ther.* **31**(1), 249–259.
  57. Lin Q., Jin S., Zong Y., Yu H., Zhu Z., Liu G., Kou L., Wang Y., Qiu J.-L., Li J., Gao C. (2021) High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nat. Biotechnol.* **39**(8), 923–927.
  58. Collias D., Beisel C.L. (2021) CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat. Commun.* **12**(1), 555.
  59. Kweon J., Yoon J.-K., Jang A.-H., Shin H.R., See J.-E., Jang G., Kim J.-I., Kim Y. (2021) Engineered prime editors with PAM flexibility. *Mol. Ther.* **29**(6), 2001–2007.
  60. Oh Y., Lee W., Hur J.K., Song W.J., Lee Y., Kim H., Gwon L.W., Kim Y.-H., Park Y.-H., Kim C.H., Lim K.-S., Song B.-S., Huh J.-W., Kim S.-U., Jun B.-H., Jung C., Lee S.H. (2022) Expansion of the prime editing modality with Cas9 from *Francisella novicida*. *Genome Biol.* **23**(1), 92.
  61. Hua K., Jiang Y., Tao X., Zhu J. (2020) Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol. J.* **18**(11), 2167–2169.
  62. Grünwald J., Miller B.R., Szalay R.N., Cabeciras P.K., Woodilla C.J., Holtz E.J.B., Petri K., Joung J.K. (2022) Engineered CRISPR prime editors with compact, untethered reverse transcriptases. *Nat. Biotechnol.* **41**, 337–343.
  63. Zhi S., Chen Y., Wu G., Wen J., Wu J., Liu Q., Li Y., Kang R., Hu S., Wang J., Liang P., Huang J. (2022)

- Dual-AAV delivering split prime editor system for *in vivo* genome editing. *Mol. Ther.* **30**(1), 283–294.
64. Böck D., Rothgangl T., Villiger L., Schmidheini L., Matsushita M., Mathis N., Ioannidi E., Rimann N., Grisch-Chan H.M., Kreutzer S., Kontarakis Z., Kopf M., Thöny B., Schwank G. (2022) *In vivo* prime editing of a metabolic liver disease in mice. *Sci. Transl. Med.* **14**(636), eabl9238.
  65. Song M., Lim J.M., Min S., Oh J.-S., Kim D.Y., Woo J.-S., Nishimasu H., Cho S.-R., Yoon S., Kim H.H. (2021) Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain. *Nat. Commun.* **12**(1), 5617.
  66. Velimirovic M., Zanetti L.C., Shen M.W., Fife J.D., Lin L., Cha M., Akinci E., Barnum D., Yu T., Sherwood R.I. (2022) Peptide fusion improves prime editing efficiency. *Nat. Commun.* **13**(1), 3512.
  67. Liu N., Zhou L., Lin G., Hu Y., Jiao Y., Wang Y., Liu J., Yang S., Yao S. (2022) HDAC inhibitors improve CRISPR-Cas9 mediated prime editing and base editing. *Mol. Ther. – Nucl. Acids.* **29**, 36–46.
  68. Park S.-J., Jeong T.Y., Shin S.K., Yoon D.E., Lim S.-Y., Kim S.P., Choi J., Lee H., Hong J.-I., Ahn J., Seong J.K., Kim K. (2021) Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor. *Genome Biol.* **22**(1), 170.
  69. Dahlman J.E., Abudayyeh O.O., Joung J., Gootenberg J.S., Zhang F., Konermann S. (2015) Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat. Biotechnol.* **33**(11), 1159–1161.
  70. Liu G., Yin K., Zhang Q., Gao C., Qiu J.L. (2019) Modulating chromatin accessibility by transactivation and targeting proximal dsgRNAs enhances Cas9 editing efficiency *in vivo*. *Genome Biol.* **20**, 145.
  71. Eggenschwiler R., Gschwendtberger T., Felski C., Jahn C., Langer F., Sternecker J., Hermann A., Lühmann J., Steinemann D., Haase A., Martin U., Petri S., Cantz T. (2021) A selectable all-in-one CRISPR prime editing piggyBac transposon allows for highly efficient gene editing in human cell lines. *Sci. Rep.* **11**(1), 22154.
  72. Nishizawa-Yokoi A., Toki S. (2021) A piggyBac-mediated transgenesis system for the temporary expression of CRISPR/Cas9 in rice. *Plant Biotechnol. J.* **19**(7), 1386–1395.
  73. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. (2019) Доставка CRISPR/CAS-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов. *Физиология растений.* **66**(5), 339–353.
  74. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Чемерис А.В., Кулуев Б.Р. (2022) Доступный арсенал для CRISPR/Cas геномного редактирования растений. *Физиология растений.* **69**(1), 38–53.
  75. Petri K., Zhang W., Ma J., Schmidts A., Lee H., Horng J.E., Kim D.Y., Kurt I.C., Clement K., Hsu J.Y., Pinello L., Maus M.V., Joung J.K., Yeh J.-R.J. (2022) CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 189–193.
  76. Simon D.A., Tálas A., Kulcsár P.I., Biczók Z., Krausz S.L., Várady G., Welker E. (2022) PEAR, a flexible fluorescent reporter for the identification and enrichment of successfully prime edited cells. *eLife.* **11**, e69504.
  77. Schene I.F., Joore I.P., Baijens J.H.L., Stevelink R., Kok G., Shehata S., Ilcken E.F., Nieuwenhuis E.C.M., Bolhuis D.P., van Rees R.C.M., Spelier S.A., van der Doef H.P.J., Beekman J.M., Houwen R.H.J., Nieuwenhuis E.E.S., Fuchs S.A. (2022) Mutation-specific reporter for optimization and enrichment of prime editing. *Nat. Commun.* **13**(1), 1028.
  78. Levesque S., Mayorga D., Fiset J.-P., Goupil C., Düringer A., Loiseau A., Bouchard E., Agudelo D., Doyon Y. (2022) Marker-free co-selection for successive rounds of prime editing in human cells. *Nat. Commun.* **13**(1), 5909.
  79. Jiao Y., Zhou L., Tao R., Wang Y., Hu Y., Jiang L., Li L., Yao S. (2021) Random-PE: an efficient integration of random sequences into mammalian genome by prime editing. *Mol. Biomed.* **2**(1), 36.
  80. Choi J., Chen W., Minkina A., Chardon F.M., Suiter C.C., Regalado S.G., Domcke S., Hamazaki N., Lee C., Martin B., Daza R.M., Shendure J. (2022) A time-resolved, multi-symbol molecular recorder via sequential genome editing. *Nature.* **608**(7921), 98–107.
  81. Hwang G.H., Jeong Y.K., Habib O., Hong S.A., Lim K., Kim J.S., Bae S. (2021) PE-Designer and PE-Analyzer: web-based design and analysis tools for CRISPR prime editing. *Nucl. Acids Res.* **49**(W1), W499–W504.
  82. Chow R.D., Chen J.S., Shen J., Chen S. (2020) A web tool for the design of prime-editing guide RNAs. *Nat. Biomed. Eng.* **5**(2), 190–194.
  83. Hsu J.Y., Grünwald J., Szalay R., Shih J., Anzalone A.V., Lam K.C., Shen M.W., Petri K., Liu D.R., Joung J.K., Pinello L. (2021) PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. *Nat. Commun.* **12**(1), 1034.
  84. Anderson M.V., Haldrup J., Thomsen E.A., Wolff J.H., Mikkelsen J.G. (2021) pegIT – a web-based design tool for prime editing. *Nucl. Acids Res.* **49**(W1), W505–W509.
  85. Siegner S.M., Karasu M.E., Schröder M.S., Kontarakis Z., Corn J.E. (2021) PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants. *BMC Bioinformatics.* **22**(1), 101.
  86. Li Y., Chen J., Tsai S.Q., Cheng Y. (2021) Easy-Prime: a machine learning-based prime editor design tool. *Genome Biol.* **22**(1), 235.
  87. Bhagwat A.M., Graumann J., Wiegandt R., Bentsen M., Welker J., Kuenne C., Preussner J., Braun T., Looso M. (2020) multicrispr: gRNA design for prime editing and parallel targeting of thousands of targets. *Life Sci. Alliance.* **3**(11), e202000757.

88. Standage-Beier K., Tekel S.J., Brafman D.A., Wang X. (2021) Prime editing guide RNA design automation using PINE-CONE. *ACS Synth. Biol.* **10**(2), 422–427.
89. Mathis N., Allam A., Kissling L., Marquart K.F., Schmidheini L., Solari C., Balázs Z., Krauthammer M., Schwank G. (2023) Predicting prime editing efficiency and product purity by deep learning. *Nat. Biotechnol.* **41**, 1151–1159.
90. Kwon J., Kim M., Bae S., Jo A., Kim Y., Lee J.K. (2022) TAPE-seq is a cell-based method for predicting genome-wide off-target effects of prime editor. *Nat. Commun.* **13**(1), 7975.
91. Li Z., Ma R., Liu D., Wang M., Zhu T., Deng Y. (2022) A straightforward plant prime editing system enabled highly efficient precise editing of rice *Waxy* gene. *Plant Sci.* **323**, 111400.
92. Jiang Y.-Y., Chai Y.-P., Lu M.-H., Han X.-L., Lin Q., Zhang Y., Zhang Q., Zhou Y., Wang X.-C., Gao C., Chen Q.-J. (2020) Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in maize. *Genome Biol.* **21**(1), 257.
93. Qiao D., Wang J., Lu M., Xin C., Chai Y., Jiang Y., Sun W., Cao Z., Guo S., Wang X., Chen Q. (2023) Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize. *J. Integr. Plant Biol.* **65**(4), 900–906.
94. Wang L., Kaya H.B., Zhang N., Rai R., Willmann M.R., Carpenter S.C.D., Read A.C., Martin F., Fei Z., Leach J.E., Martin G.B., Bogdanove A.J. (2021) Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants. *Front. Genome Ed.* **3**, 617553.
95. Biswas S., Bridgeland A., Irum S., Thomson M.J., Septiningsih E.M. (2022) Optimization of prime editing in rice, peanut, chickpea, and cowpea protoplasts by restoration of GFP activity. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(17), 9809.
96. Perroud P.-F., Guyon-Debast A., Veillet F., Kermarrec M.-P., Chauvin L., Chauvin J.-E., Gallois J.-L., Nogué F. (2022) Prime editing in the model plant *Physcomitrium patens* and its potential in the tetraploid potato. *Plant Sci.* **316**, 111162.
97. Кропочева Е.В., Лисицкая Л.А., Агапов А.А., Мусабилов А.А., Кульбачинский А.В., Есюнина Д.М. (2022) Прокариотические белки-аргонавты как инструмент биотехнологии. *Молекуляр. биология.* **56**(6), 915–936.

## Prime-Editing Methods and pegRNA Design Programs

E. V. Mikhaylova<sup>1</sup>\*, B. R. Kuluev<sup>1</sup>, G. A. Gerashchenkov<sup>1</sup>, D. A. Chemeris<sup>1</sup>,  
R. R. Garafutdinov<sup>1</sup>, A. R. Kuluev<sup>1</sup>, An. K. Baymiev<sup>1</sup>, Al. K. Baymiev<sup>1</sup>,  
and A. V. Chemeris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Science, Ufa, 450054 Russia

\*e-mail: mikhele@list.ru

It has been 10 years since CRISPR/Cas technology was applied to edit the genomes of various organisms. Its ability to produce a double-strand break in a DNA region specified by the researcher started a revolution in bioengineering. Later, the Base Editing (BE) method was developed. BE is performed via the formation of single-strand breaks by the mutant form of Cas nuclease (nickase), cross-linked with deaminases and other enzymes. It can be used to promote A→G and C→T transitions, and a C→G transversion. Just over three years ago, a new Prime Editing (PE) variant of CRISPR/Cas was invented. Unlike BE, in PE the nickase is fused with reverse transcriptase, capable of building a new DNA chain using the pegRNA template. The pegRNA consists of an elongated guide RNA with an extra sequence at the 3'-end. Prime editing makes it possible to insert the desired mutations into this extra sequence and to carry out any substitutions and indels of bases without the use of special donor DNA. To date, a number of PE variants have been proposed, and they are briefly considered in this review with an emphasis on prime editing of plant genomes. Some attention is also paid to pegRNA design programs, as well as evaluation of the efficiency of the editing. Such a variety of PE techniques is due to the opportunities of high-precision introduction of desired changes with a rather low frequency of off-target mutations in the genomes of various organisms. The relatively low efficiency of prime editing inspire researchers to offer new approaches. There is hope that further development of the technology will improve PE enough to take its rightful place among the genome targeting methods, suitable for any organisms, and will have a positive impact on the agricultural sector, industrial biotechnologies, and medicine.

**Keywords:** CRISPR, prime editing, PE, nCas9, nick, guide RNA, pegRNA, ngRNA, computer program, online tool



УДК 573.6:616.1

## ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК MEG3, TUG1 И hsa-miR-21-3p КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА<sup>#</sup>

© 2024 г. М. Abdelgawad<sup>a</sup>, Н. У. Abdallah<sup>b, c, \*</sup>, А. Fareed<sup>d</sup>, А. Е. Ahmed<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, Beni-Suef, 62511 Egypt

<sup>b</sup> Genetics Unit, Department of Histology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

<sup>c</sup> Center of Excellence in Molecular and Cellular Medicine, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

<sup>d</sup> Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

\*e-mail: hoda\_ibrahim1@med.suez.edu.eg

Поступила в редакцию 20.03.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Биомаркеры периферической крови, ввиду их неинвазивности, имеют особое значение для диагностики некоторых заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца (ИБС). Исследование экспрессии некодирующих РНК (ncРНК) открывает путь к ранней диагностике, прогнозу и лечению заболеваний. Исследована группа ncРНК как потенциальных биомаркеров у пациентов с ИБС. Участники двух сформированных групп: контрольной и ИБС – прошли собеседование и клиническое обследование. У всех были взяты образцы периферической крови и выделена плазма, в которой методом количественной ПЦР оценивали уровни целевых ncРНК, выбранных на основании анализа литературы и биоинформационного анализа. Созданная панель включала длинные ncРНК (lncRNA) MEG3, TUG1 и SRA1, а также одну микроРНК – hsa-miR-21-3p. Выявлено статистически значимое повышение уровней MEG3, TUG1 и hsa-miR21-3p у пациентов с ИБС по сравнению с участниками контрольной группы ( $p < 0.01$ ), в то время как для SRA1 замечена статистически незначимая тенденция к снижению экспрессии ( $p > 0.05$ ). Для исследованных ncРНК выявлена значимая сильная корреляция с заболеваемостью, возрастом и курением. При построении сети выявлена сильная взаимосвязь между MEG3 и TUG1. По результатам ROC-анализа сделан вывод, что hsa-miR-21-3p можно рассматривать в качестве перспективного биомаркера ИБС. Более того, для MEG3 и TUG1 выявлена заметная диагностическая значимость, хотя меньшая, чем для hsa-miR-21-3p. Различия в уровнях экспрессии этих трех ncРНК между группами ИБС и контроля были статистически значимыми. Таким образом, уровни MEG3, TUG1 и hsa-miR-21-3p в плазме можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров заболеваемости и диагностики ИБС.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, MEG3, TUG1, некодирующие РНК, длинные некодирующие РНК, биомаркеры

**DOI:** 10.31857/S0026898424010035, **EDN:** OHPZAR

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malakar A.K., Choudhury D., Halder B., Paul P., Uddin A., Chakraborty S. (2019) A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J. Cell Physiol.* **234**(10), 16812–16823. doi: 10.1002/jcp.28350.
2. Wan Q., Qian S., Huang Y., Zhang Y., Peng Z., Li Q., Shu B., Zhu L., Wang M. (2020) Drug discovery for coronary artery disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1177**, 297–339.
3. Hunt S.A., Abraham W.T., Chin M.H., Feldman A.M., Francis G.S., Ganiats T.G., Jessup M., Konstam M.A., Mancini D.M., Michl K., Oates J.A., Rahko P.S., Silver M.A., Stevenson L.W., Yancy C.W. (2009) Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the

<sup>#</sup> Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

- American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines developed in collaboration with the International society for heart and lung transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**(15), e1–e90. doi: 10.1016/j.jacc.2008.11.013
4. Netto J., Teren A., Burkhardt R., Willenberg A., Beutner F., Henger S., Schuler G., Thiele H., Isermann B., Thiery J., Scholz M., Kaiser T. (2022) Biomarkers for non-invasive stratification of coronary artery disease and prognostic impact on long-term survival in patients with stable coronary heart disease. *Nutrients.* **14**(16), 3433. doi: 10.3390/nu14163433
  5. Parnanathan R., Jain S.K. (2020) Novel invasive and noninvasive cardiac-specific biomarkers in obesity and cardiovascular diseases. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **18**(1), 10–30. doi: 10.1089/met.20190073
  6. Cardona-Monzonis A., Garcia-Gimenez J.L., Mena-Molla S., Pareja-Galeano H., de la Guia-Galipienso F., Lippi G., Pallardo F.V., Sanchis-Gomar F. (2020) Non-coding RNAs and Coronary Artery Disease. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Ed. Xiao J. Singapore: Springer Singapore, V. 1229, pp. 273–285. doi: 10.1007/978-981-15-1671-9\_16
  7. Poller W., Dimmeler S., Heymans S., Zeller T., Haas J., Karakas M., Leistner D.M., Jakob P., Nakagawa S., Blankenberg S., Engelhardt S., Thum T., Weber C., Meder B., Hajjar R., Landmesser U. (2018) Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur. Heart J.* **39**(29), 2704–2716. doi: 10.1093/eurheartj/ehx165
  8. Adams V. (2019) Assessment of micro ribonucleic acids after exercise: Is this the future to detect coronary artery disease at its early stage? *Eur. J. Prev. Cardiol.* **26**(4), 346–347. doi: 10.1177/2047487318811958
  9. Zou L., Ma X., Lin S., Wu B., Chen Y., Peng C. (2019) Long noncoding RNA-MEG3 contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury through suppression of MIR-7-5p expression. *Biosci. Rep.* **39**(8), BSR20190210. doi: 10.1042/BSR20190210
  10. Piccoli M.T., Gupta S.K., Viereck J., Foinquinos A., Samolovac S., Kramer F.L., Garg A., Remke J., Zimmer K., Batkai S., Thum T. (2017) Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched lncRNA Meg3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Circ. Res.* **121**(5), 575–583. doi: 10.1161/CIRCRESA-HA.117.310624
  11. Zhang J., Liang Y., Huang X., Guo X., Liu Y., Zhong J., Yuan J. (2019) STAT3-induced upregulation of lncRNA MEG3 regulates the growth of cardiac hypertrophy through miR-361-5p/HDAC9 axis. *Sci. Rep.* **9**(1), 460. doi: 10.1038/s41598-018-36369-1
  12. Wu Z., He Y., Li D., Fang X., Shang T., Zhang H., Zheng X. (2017) Long noncoding RNA MEG3 suppressed endothelial cell proliferation and migration through regulating miR-21. *Am. J. Transl. Res.* **9**(7), 3326–3335.
  13. Li F.P., Lin D.Q., Gao L.Y. (2018) LncRNA TUG1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cell and atherosclerosis through regulating miRNA-21/PTEN axis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**(21), 7439–7447. doi: 10.26355/eurrev-201811-16284
  14. Guo Y., Sun Z., Chen M., Lun J. (2021) LncRNA TUG1 regulates proliferation of cardiac fibroblast via the miR-29b-3p/TGF- $\beta$ 1 axis. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 646806. doi: 10.3389/fcvm.2021646806
  15. Zhang G., Ni X. (2021) Knockdown of TUG1 rescues cardiomyocyte hypertrophy through targeting the miR-497/MEF2C axis. *Open Life Sci.* **16**(1), 242–251. doi: 10.1515/biol-2021-0025
  16. Foulds C.E., Tsimelzon A., Long W., Le A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (2010) Research resource: expression profiling reveals unexpected targets and functions of the human steroid receptor RNA activator (SRA) gene. *Mol. Endocrinol.* **24**(5), 1090–1105. doi: 10.1210/me.2009-0427.
  17. Ren S., Zhang Y., Li B., Bu K., Wu L., Lu Y., Lu Y., Qiu Y. (2019) Downregulation of lncRNA-SRA participates in the development of cardiovascular disease in type II diabetic patients. *Exp. Ther. Med.* **17**(5), 3367–3372. doi: 10.3892/etm.20197362
  18. Yang S., Sun J. (2018) LncRNA SRA deregulation contributes to the development of atherosclerosis by causing dysfunction of endothelial cells through repressing the expression of adipose triglyceride lipase. *Mol. Med. Rep.* **18**(6), 5207–5214. doi: 10.3892/mmr.20189497
  19. Huang Z., Shi J., Gao Y., Cui C., Zhang S., Li J., Zhou Y., Cui Q. (2019) HMDD v3.0: A database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D1013–D1017. doi: 10.1093/nar/gky1010
  20. Huang H.Y., Lin Y.C., Li J., Huang K.Y., Shrestha S., Hong H.C., Tang Y., Chen Y.G., Jin C.N., Yu Y., Xu J.T., Li Y.M., Cai X.X., Zhou Z.Y., Chen X.H., Pei Y.Y., Hu L., Su J.J., Cui S.D., Wang F., Xie Y.Y., Ding S.Y., Luo M.F., Chou C.H., Chang N.W., Chen K.W., Cheng Y.H., Wan X.H., Hsu W.L., Lee T.Y., Wei F.X., Huang H.D. (2020) MiRTarBase 2020: Updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res.* **48**(D1), D148–D154. doi: 10.1093/nar/gkz896
  21. Chang L., Zhou G., Soufan O., Xia J. (2020) miRNet 2.0: Network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* **48**(W1), W244–W251. doi: 10.1093/nar/gkaa467
  22. Metsalu T., Vilo J. (2015) ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **43**(W1), W566–W570. doi: 10.1093/nar/gkv468
  23. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models. *Genome Res.* **13**(11), 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
  24. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* **25**(4), 402–408. doi: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
  25. Saygili H., Bozgeyik I., Yumrutas O., Akturk E., Bagis H. (2021) Differential expression of long noncoding RNAs in patients with coronary artery disease. *Mol. Syndromol.* **12**(6), 372–378. doi: 10.1159/000517077
  26. Bai Y., Zhang Q., Su Y., Pu Z., Li K. (2019) Modulation of the proliferation/apoptosis balance of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by In-

- cRNA-MEG3 via regulation of miR-26a/smad1 axis. *Int. Heart J.* **60**(2), 444–450. doi: 10.1536/IHJ.18-195
27. Wu H., Zhao Z.A., Liu J., Hao K., Yu Y., Han X., Li J., Wang Y., Lei W., Dong N., Shen Z., Hu S. (2018) Long noncoding RNA Meg3 regulates cardiomyocyte apoptosis in myocardial infarction. *Gene Ther.* **25**(8), 511–523. doi: 10.1038/s41434-018-0045-4
  28. Su Q., Liu Y., Lv X.W., Dai R.X., Yang X.H., Kong B.H. (2020) LncRNA TUG1 mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-132-3p/HDAC3 axis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **318**(2), H332–H344. doi: 10.1152/ajpheart.00444.2019
  29. Yan H.Y., Bu S.Z., Zhou W.B., Mai Y.F. (2018) TUG1 promotes diabetic atherosclerosis by regulating proliferation of endothelial cells via Wnt pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**(20), 6922–6929.
  30. Kumar D., Narang R., Sreenivas V., Rastogi V., Bhatta J., Saluja D., Srivastava K. (2020) Circulatory miR-133b and miR-21 as novel biomarkers in early prediction and diagnosis of coronary artery disease. *Genes (Basel)*. **11**(2), 164. doi: 10.3390/genes11020164
  31. Ren J., Zhang J., Xu N., Han G., Geng Q., Song J., Li S., Zhao J., Chen H. (2013) Signature of circulating MicroRNAs As potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One.* **8**(12), e80738. doi: 10.1371/journal.pone.0080738
  32. Fleissner F., Jazbutyte V., Fiedler J., Gupta S.K., Yin X., Xu Q., Galuppo P., Kneitz S., Mayr M., Ertl G., Bauersachs J., Thum T. (2010) Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism. *Circ. Res.* **107**(1), 138–143. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216770
  33. Weber M., Baker M.B., Moore J.P., Searles C.D. (2010) MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**(4), 643–648. doi: 10.1016/j.bbrc.201002.045
  34. Abdallah H.Y., Hassan R., Fareed A., Abdelgawad M., Mostafa S.A., Mohammed E.A.-M. (2022) Identification of a circulating microRNAs biomarker panel for non-invasive diagnosis of coronary artery disease: case–control study. *BMC Cardiovasc. Disord.* **22**(1), 286. doi: 10.1186/s12872-022-02711-9
  35. Mohammed A., Shaker O.G., Khalil M.A.F., Gomaa M., Fathy S.A., Abu-El-Azayem A.K., Samy A., Aboelnor M.I., Gomaa M.S., Zaki O.M., Erfan R. (2022) Long non-coding RNA NBAT1, TUG1, miRNA-335, and miRNA-21 as potential biomarkers for acute ischemic stroke and their possible correlation to thyroid hormones. *Front Mol. Biosci.* **9**, 914506. doi: 10.3389/fmolb.2022914506

## Long Noncoding RNAs MEG3, TUG1, and hsa-miR-21-3p are Potential Diagnostic Biomarkers for Coronary Artery Disease

M. Abdelgawad<sup>1</sup>, H. Y. Abdallah<sup>2, 3, \*</sup>, A. Fareed<sup>4</sup>, and A. E. Ahmed<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology and Life Sciences Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, Beni-Suef, 62511 Egypt

<sup>2</sup> Genetics Unit, Department of Histology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

<sup>3</sup> Center of Excellence in Molecular and Cellular Medicine, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

<sup>4</sup> Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, 41522 Egypt

\*e-mail:hoda\_ibrahim1@med.suez.edu.eg

Peripheral blood biomarkers are of particular importance to diagnose certain diseases including coronary artery disease (CAD) due to their non-invasiveness. Investigating the expression of noncoding RNAs (ncRNAs) paves the way to early disease diagnosis, prognosis, and treatment. Consequently, in this research, we aimed to investigate a panel of ncRNAs as potential biomarkers in patients with coronary artery disease. Two different groups have been designed (control and CAD). All participants were subjected to interviews and clinical examinations. Peripheral blood samples were collected, and plasma was extracted. At the same time, target ncRNAs have been selected based on literature review and bioinformatic analysis, and later they underwent investigation using quantitative real-time PCR. The selected panel encompassed the long non-coding RNAs (lncRNAs) MEG3, TUG1, and SRA1, and one related microRNA (miRNA): hsa-miR-21-3p. We observed statistically significant upregulation in MEG3, TUG1, and hsa-miR21-3p in CAD patients compared to control participants ( $p$ -value < 0.01). Nevertheless, SRA1 exhibited downregulation with no statistical significance ( $p$ -value > 0.05). All ncRNAs under study displayed a significantly strong correlation with disease incidence, age, and smoking. Network construction revealed a strong relationship between MEG3 and TUG1. ROC analysis indicated high potentiality for hsa-miR-21-3p to be a promising biomarker for CAD. Moreover, MEG3 and TUG1 displayed distinguished diagnostic discrimination but less than hsa-miR-21-3p, all of them exhibited strong statistical significance differences between CAD and control groups. Conclusively, this research pinpointed that MEG3, TUG1, and hsa-miR-21-3p are potential biomarkers of CAD incidence and diagnosis.

**Keywords:** Coronary artery disease, MEG3, TUG1, noncoding RNA, lncRNA, biomarker

УДК 579.65:577.21

## ЦЕЛОСТНОСТЬ ГЕНОМА *Bacillus velezensis* ПОСЛЕ ДВУХЛЕТНЕГО ЭКСПОНИРОВАНИЯ В ОТКРЫТОМ КОСМОСЕ

© 2024 г. С. В. Фиалкина<sup>a, b, \*</sup>, Е. А. Дешева<sup>a</sup>, А. Л. Ракитин<sup>c</sup>, О. И. Орлов<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия

<sup>b</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, 123098 Россия

<sup>c</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: fialkina-fsv@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 12.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Спорообразующие бактерии обладают уникальной устойчивостью к негативным условиям окружающей среды, включая агрессивные факторы космического пространства, и являются прекрасной моделью для изучения молекулярных механизмов адаптации и стратегий выживания. Проведен анализ генома бактерий *Bacillus velezensis*, оставшихся жизнеспособными после двухлетнего экспонирования в открытом космосе на внешней поверхности Международной космической станции в рамках космического эксперимента “Тест”. Сравнительный анализ черновых версий геномов опытного штамма и наземного контрольного штамма не выявил крупных перестроек генома, средняя нуклеотидная идентичность составила 99.98%, что свидетельствует о способности микроорганизмов поддерживать стабильность генома в условиях космоса, что обусловлено как повышенной стрессоустойчивостью бактериальных спор, так и эффективной работой системы репарации повреждений ДНК. Сравнение геномов опытного и контрольного штаммов *B. velezensis* выявило девять точечных замен, три из которых находятся в межгенных участках, шесть в белоккодирующих генах, из них три миссенс-мутации, две делеции нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания, одна синонимическая замена. Определены профили генов “домашнего хозяйства”. При проведении типирования MLST, установлено, что аллельные профили штаммов *B. velezensis* T15.2 и 924 не соответствуют ни одному из описанных ранее типов нуклеотидной последовательности. Представленные результаты свидетельствуют о способности бактерий *B. velezensis* длительное время сохранять жизнеспособность спор и целостность генома в экстремальных условиях открытого космоса, что важно для проблемы планетарной защиты, а также возможности осуществления биотехнологических процессов на основе *B. velezensis* при освоении космоса.

**Ключевые слова:** космический эксперимент “Тест”, *Bacillus velezensis*, космические факторы, низкая околоземная орбита, бактериальные споры, международная космическая станция

**DOI:** 10.31857/S0026898424010047, **EDN:** ОНОJPL

### ВВЕДЕНИЕ

Агрессивные факторы космического пространства негативно влияют на любые формы жизни. Однако многие экстремофильные виды микроорганизмов обладают способностью противостоять неблагоприятным условиям космоса и сохранять жизнеспособность даже при длительном нахождении в подобных условиях. Космическая среда имеет целый набор стрессовых факторов, в их числе солнечное УФ-излучение, галактическое космическое излучение, солнечное космическое излучение, высокий космиче-

ский вакуум, экстремальные колебания температур и микрогравитация [1].

Проведены эксперименты, направленные на изучение влияния отдельных факторов космического пространства на живые организмы. Так, споры *Bacillus subtilis* сохранили жизнеспособность на установке длительного воздействия НАСА (LDEF) в течение 6 лет [2]. Бактериальные и грибные споры, цианобактерии, лишайники выжили в течение 15 мес. на платформах EXPOSE-E и EXPOSE-R на Международной космической станции (МКС) [3]. Споры бакте-

рий и грибов изучали в эксперименте “Биориск” [4]; цианобактерии и лишайники пережили 10-дневную космическую экспозицию в рамках космического эксперимента *Lithopanspermia* [5]; *Deinococcus radiodurans* выжил после 1 г экспонирования в миссии “Танпопо” [6].

В нашем космическом эксперименте “Тест-экспонат” суспензию спор бактерий вносили в толщу ваты, накрученной на металлический тампонодержатель, а космонавт при внешнекорабельной деятельности размещал этот прибор на внешней поверхности МКС.

Важной задачей остается изучение реакций микроорганизмов на воздействие факторов космического пространства на молекулярном уровне, выявление механизмов сохранения жизнеспособности и адаптации к условиям космоса, влияние на генетический аппарат клетки, метаболизм, биохимическую и физиологическую активность. Исследования в этом направлении позволили выявить влияние космических условий на геном, протеом и транскриптом микроорганизмов, скорость их пролиферации, подвижность, формирование биопленок, патогенность и устойчивость к антибактериальным препаратам [7–12].

Однако существующих данных недостаточно для детального понимания многофункциональной молекулярной структуры клеток, перенесших стресс космического воздействия, поэтому необходим всесторонний и детальный анализ молекулярных реакций биологических систем.

Грамположительные аэробные или факультативно-анаэробные, образующие перитрихальные жгутики, бактерии рода *Bacillus* способны формировать эндоспоры, обеспечивающие их выживание в самых экстремальных условиях, поэтому они представляют собой прекрасные модели для астробиологических исследований.

В нашем космическом эксперименте “Тест-экспонат” бактериальные споры *B. velezensis*, споры гриба *Aureobasidium pullulans* и археи *Methanosarcina mazei* S-6T экспонировались в течение 2 лет на низкой околоземной орбите на установке, закрепленной с внешней стороны поверхности МКС, в условиях открытого космоса. После возвращения на Землю образцы были доставлены в лабораторию, и количество жизнеспособных клеток определено культуральным методом. Дальнейшие исследования были направлены на молекулярно-биологические свойства выживших микроорганизмов. Исследования свойств жизнеспособных клеток *M. mazei* S-6T описаны ранее [13], изучение *A. pullulans* еще не завершено, молекулярно-генетические исследования *B. velezensis* описаны в данной работе.

В представленной работе проведен сравнительный анализ геномов штамма-экспоната *B. velezensis* T15.2 и штамма наземного контроля *B. velezensis* 924, который служил референсным штаммом при изучении влияния стрессовых факторов открытого космоса на целостность молекулярно-генетических структур жизнеспособных клеток.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Бактериальные штаммы.** В работе исследовали штамм *B. velezensis* T15.2, который экспонировали в течение 2 лет (2017–2019 гг.) на внешней поверхности МКС в рамках космического эксперимента “Тест-экспонат”. Этот штамм является производным штамма *B. velezensis* 924, использованного нами в качестве наземного контроля и референсного штамма. Штамм *B. velezensis* 924 был выделен ранее в космическом эксперименте “Тест” из космической пыли, отобранной с поверхности иллюминатора на МКС на границе стекла и обоймы при внешнекорабельной деятельности (ВКД-35) в 2013 г. [14].

**Выделение геномной ДНК и секвенирование.** Жидкие культуры выращивали в 5 мл бульона Лурия–Бертани (LB) при 30°C и активном перемешивании в течение 24 ч. Осадок биомассы получен при центрифугировании (15 мин, 8228 g, центрифуга Eppendorf 5810R).

Геномную ДНК выделяли с использованием набора DNeasy PowerSoil Pro Kit (“QIAGEN”, Германия) по протоколу, рекомендованному фирмой. Количество выделенной ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием наборов Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) по протоколам фирмы. ДНК секвенировали с использованием технологии Illumina. Для приготвления библиотек ДНК фрагментировали в ультразвуковом аппарате Bioruptor UCD 200 (“Diagenode”, США) в течение 10 мин при минимальной мощности (5 циклов 30 с вкл. и 90 с выкл.). Парные библиотеки ДНК (300 × 2) получены с использованием набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (“NEB”, США) в соответствии с условиями производителя. Количество и качество библиотек определяли с использованием системы капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (“Agilent”, США). Библиотеки ДНК секвенировали с использованием прибора MiSeq (“Illumina”, США) и набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов; “NEB”).

**Биоинформатические методы.** Полученные в результате секвенирования парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы flash [15], затем последовательности низкого качества удаляли с использованием программы

Sicklev.1.33 ( $q = 30$ ). В результате получили не менее чем 30-кратное покрытие каждого генома.

Идентификацию белоккодирующих генов и генов рРНК, а также теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST [16].

Для нахождения однонуклеотидных замен и делеций чтения штамма *B. velezensis* T15.2 были выравнены с контигами штамма *B. velezensis* 924 программой Bowtie2 [17], контиги собраны программой Spades [18]. Поиск мутаций выполняли с помощью программы FreeBayes. В качестве референсного штамма использовали *B. velezensis* 924.

Среднюю нуклеотидную идентичность ANI (average nucleotide identity) оценивали с использованием программных продуктов, представленных на сайте [http://fbac.dmicrobe.cn/tools/ANI\\_calculator](http://fbac.dmicrobe.cn/tools/ANI_calculator) [19].

**MLST-типирование и филогенетический анализ.** Типирование на основе мультилокусных последовательностей (MLST) для анализа аллелей проведено в соответствии с сервисом базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org>), основанной на анализе семи генов домашнего хозяйства: *glpF*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pusA*, *rpoD*, *tpiA*, кодирующих дегидратазу дигидроксикислот (*ilvD*), белок, вовлеченный в поглощение глицерина (*glpF*), фосфоацетилтрансферазу (*pta*), фосфорибозиламиномидазолкарбоксамид-формилтрансферазу (*purH*), пируваткарбоксилазу (*pusA*), субъединицу D РНК-полимеразы (*rpoD*), триозофосфатизомеразу (*tpiA*).

Полученным последовательностям локусов присваивали номера в соответствии с сервисом базы данных PubMLST. На основе комбинации номеров аллелей используемых локусов определяли тип нуклеотидной последовательности

**Таблица 1.** Результаты секвенирования геномов

Параметр	<i>B. velezensis</i> 924	<i>B. velezensis</i> T15.2
Объем секвенирования, п.н.	429129360	382868730
Число чтений	1589368	1466930
Средняя длина чтения, п.н.	270	261
Суммарная длина контигов, н.	3971083	3951523
Количество контигов	72	19
Длина контига N50, н.	2127125	2127125

**Таблица 2.** Результаты аннотации геномов

Параметр	<i>B. velezensis</i> 924	<i>B. velezensis</i> T15.2
Белоккодирующие гены (CDS)	4075	4075
в том числе с предсказанными функциями	3256 (79.9%)	3256 (79.9%)
Гены тРНК	87	87
Число рибосомных оперонов (16S)	8	8
Содержание GC, %	46.3	46.3

(ST) штаммов в соответствии с сервисом указанной базы данных.

Филогенетический анализ слитых *in silico* последовательностей семи локусов генов домашнего хозяйства проводили методом связывания ближайших соседей (neighbour-joining) [20] в программном обеспечении MEGA 11 [21]. Для анализа и сборки последовательностей использовали программу Vector NTI 9.0. Нуклеотидные последовательности родственных штаммов *B. velezensis* загружены из базы данных PubMLST.

**гMLST-анализ.** Рибосомное мультилокусное типирование последовательностей (гMLST) выполнено при анализе вариации 53 генов *rps*, кодирующих бактериальные рибосомные белки [22].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Секвенирование генома

В результате секвенирования геномов собрано 72 контига *B. velezensis* 924 со средней длиной прочтения 270 п.н. и 19 контигов *B. velezensis* T15.2 со средней длиной прочтения 261 п.н. Объем секвенирования составил 429129360 п.н. у штамма 924 и 382868730 п.н. у T15.2. Результаты секвенирования представлены в табл. 1. Черновые (драфт)-геномы *B. velezensis* T15.2 и *B. velezensis* 924 депонированы в базу данных GenBank под номерами JARIYD000000000 и JARIYE000000000 соответственно; Bioproject – PRJNA942592.

### Аннотация собранных драфт-геномов

В собранных геномах *B. velezensis* 924 и *B. velezensis* T15.2 обнаружены 4063 последовательности, кодирующие полипептиды (CDS), 87 генов тРНК и восемь кластеров генов 16S рРНК (табл. 2).

	<i>B. velezensis</i> s92	<i>B. velezensis</i> T15.2	
<i>B. velezensis</i> 924	<b>100%</b>	<b>99.98%</b>	<i>B. velezensis</i> 924
<i>B. velezensis</i> T15.2	<b>99.98%</b>	<b>100%</b>	<i>B. velezensis</i> T15.2
	<i>B. velezensis</i> s92	<i>B. velezensis</i> T15.2	

Рис. 1. Нуклеотидная идентичность (%) геномов *B. velezensis* 15.2 и референс-штамма *B. velezensis* 924.

Сравнительный анализ нуклеотидной идентичности генома, проведенный при помощи калькулятора ANI, штамма *B. velezensis* T15.2, экспонированного в открытом космосе, и наземного контроля (*B. velezensis* 924), выявил 99.98% сходства (рис. 1), что говорит о способности бактерий сохранять значительную стабильность генома в условиях космического пространства, вероятно, благодаря эффективным механизмам защиты и репарации молекул ДНК.

#### Исследование однонуклеотидного полиморфизма (SNP), вставок/делеций (InDel) в геноме *B. velezensis*

Сравнение геномов штаммов *B. velezensis* T15.2 и 924 выявило семь точечных замен и две делеции нуклеотидов. Три замены найдены в межгенных участках: между генами, кодирующими белок с неизвестной функцией и протеазу HtpX, соответственно, в позиции 1694814 (контиг 1) обнаружена замена С на Т; между геном, кодирующим β-1,4-глюканазу, и геном, кодирующим белок с неизвестной функцией, в позиции 1118526 (контиг 1) обнаружена замена G на С; между геном пермеазы и геном, кодирующим ADP-рибозопирофосфатазу, в позиции 21542 (контиг 3) обнаружена замена G на Т. В генах, кодирующих белки, обнаружено шесть SNP, три из которых миссенс-мутации, приводящие к несинонимичным заменам аминокислотных остатков в белках, одна синонимичная замена и делеции нуклеотидов в двух генах, вызывающие сдвиг открытой рамки считывания.

В гене *adhP*, кодирующем алкогольдегидрогеназу, в позиции 1172350 (контиг 1) най-

дена замена С на А; в гене *fumC*, кодирующем фумаратгидратазу, в позиции 196354 (контиг 2) обнаружена замена G на А; в гене, гомологичном *lolA*, кодирующем белок-переносчик липопротеинов наружной мембраны, в позиции 135281 (контиг 3) найдена замена А на Т. Мутации в указанных генах приводят к заменам аминокислотного остатка. Такие точечные замены могут быть причиной изменения активности ферментов, однако для точного понимания влияния этих замен на активность ферментов требуется их дальнейшее изучение. Замена А на Т в позиции 190499 (контиг 4) гена *gltB* (*yerD*), контролирующего синтез фермента глутаматсинтазы, является синонимической мутацией, которая не приводит к замене аминокислотного остатка.

В двух генах обнаружены делеции нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания. В гене, кодирующем белок с неизвестной функцией, обнаружена делеция Т в позиции 384025 (контиг 2), а в гене *uvrY*, кодирующем регуляторный белок, найдена делеция G в позиции 398978 (контиг 3). Результаты представлены в табл. 3.

#### MLST и филогенетический анализ

С использованием MLST-типирования проанализированы локусы отдельных генов домашнего хозяйства и определен аллельный профиль штаммов *B. velezensis* 15.2 и *B. velezensis* 924, который полностью совпадал по следующим фрагментам генов: *glpF*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pusA*, *rpoD*, *tpiA* (табл. 4).

Таблица 3. SNP, обнаруженные в геноме *B. velezensis* T15.2, относительно *B. velezensis* 924

Контиг	Позиция	Референсный геном	<i>B. velezensis</i> T15.2	Тип мутации	Ближайший аналог гена, GenBank BLAST/UniProt (по н.п.)	Покрытие/идентичность, GenBank BLAST/UniProt %/% (по н.п.)	Продукт
1	1694814	C	T	Межгенный участок			
1	1172350	C	A	Миссенс-мутация	<i>adhP</i> <sup>1</sup> <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2)	100/100 <sup>1</sup>	Алкогольдегидрогеназа (WP_025851115.1) <sup>1</sup>
1	1118526	G	C	Межгенный участок			
2	384025	СТТ	СА	Сдвиг рамки считывания	<i>B. velezensis</i> 8-2 <sup>1</sup> (CP028439.1)	100/100 <sup>1</sup>	Гипотетический белок (WP_003151476.1) <sup>1</sup>
2	196354	G	A	Миссенс-мутация	<i>fumC</i> <sup>1</sup> <i>B. velezensis</i> штамм YC_89 (CP092499.1)	100/100 <sup>1</sup>	Фумаратгидратаза класса II (WP_003151808.1) <sup>1</sup>
3	398978	CGA	CA	Сдвиг рамки считывания	<i>uvrY</i> <sup>1</sup> <i>Bacillus</i> sp. ZY-1 (CP027061.1)	100/100 <sup>1</sup>	Регуляторный белок (AKL74816.1) <sup>1</sup>
3	135281	A	T	Миссенс-мутация	<i>lolA</i> <sup>1</sup> <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2) <i>ydcC</i> <sup>2</sup> <i>B. subtilis</i> 168 (AB001488.1)	100/100 <sup>1</sup> 88/82.69 <sup>2</sup>	Белок-переносчик липопroteинов наружной мембраны (WP_003156191) <sup>1</sup> . Белок, участвующий в споруляции (P96619) <sup>2</sup>
3	21542	G	T	Межгенный участок			
4	190499	A	T	Синонимичная мутация	<i>gltB</i> <sup>1</sup> <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2) <i>yerD</i> <sup>2</sup> <i>B. subtilis</i> (штамм 168)	100/99.94 <sup>1</sup> 91/74.32 <sup>2</sup>	Флавиномононуклеотид связывающая глутаматсинтаза (WP_275953733.1) <sup>1</sup> Большая субъединица глутамат синтазы (P39812) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> – GenBank BLAST, <sup>2</sup> – UniProt.

Таблица 4. Аллельный профиль штаммов *B. velezensis* T15.2 и *B. velezensis* 924

<i>B. velezensis</i> T15.2/ <i>B. velezensis</i> 924	<i>glpF</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>rusA</i>	<i>rpoD</i>	<i>trpA</i>
Аллель	29	62	54	50	51	30	77
Длина, п.н.	384	471	414	399	399	384	420
Контиг	1	1	2	4	1	1	2
Идентичность, %	100	100	100	100	100	100	100

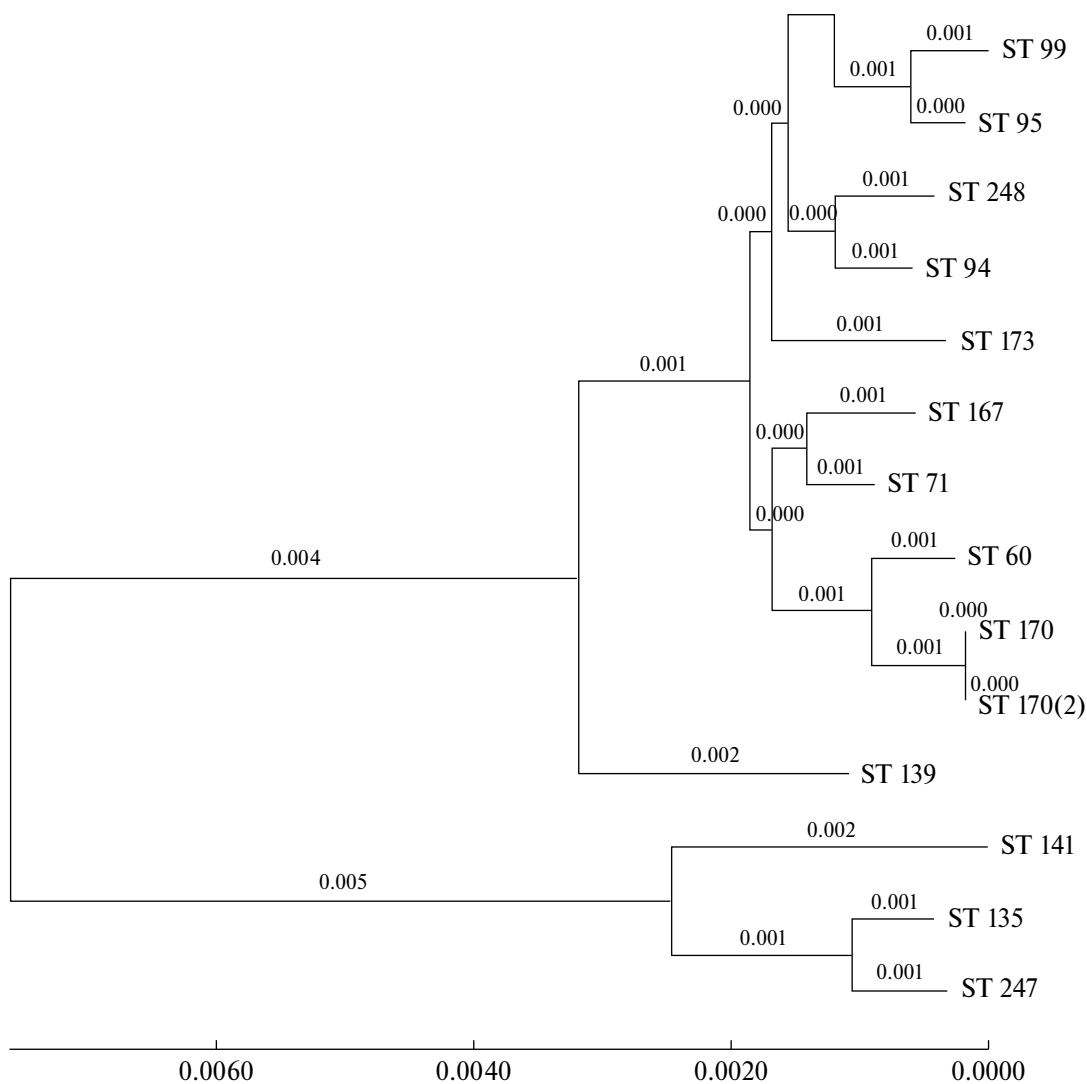
Основываясь на данных MLST-типирования, провели филогенетический анализ семи генов домашнего хозяйства методом связывания ближайших соседей (neighbour-joining). Слитые *in silico* нуклеотидные последовательности генов домашнего хозяйства штаммов T15.2 и 924 сравнивали с последовательностями 14 родственных штаммов *B. velezensis*, принадлежащих к разным

ST-типам, представленным в базе данных PubMLST.

На основе комбинации номеров аллелей используемых локусов не удалось отнести изучаемые штаммы ни к одному из существующих в базе данных ST-типов в соответствии с сервисом базы данных pubMLST, а проведенный филогенетический анализ показывает их связь с 13 родственными ST-типами *B. velezensis* (рис. 2).

Согласно комбинации номеров аллелей наиболее сходными оказались ST-71, ST-95 и ST-170 с несовпадением по двум аллелям. Отнести анализируемый штамм к типу ST-71 не позволяет отличие по аллелям *ilvD* и *trpA*. ST-95 не включает аллели *rusA*-51 и *trpA*-77, в ST-170 не совпадают аллели *ilvD* и *rusA* (табл. 5).

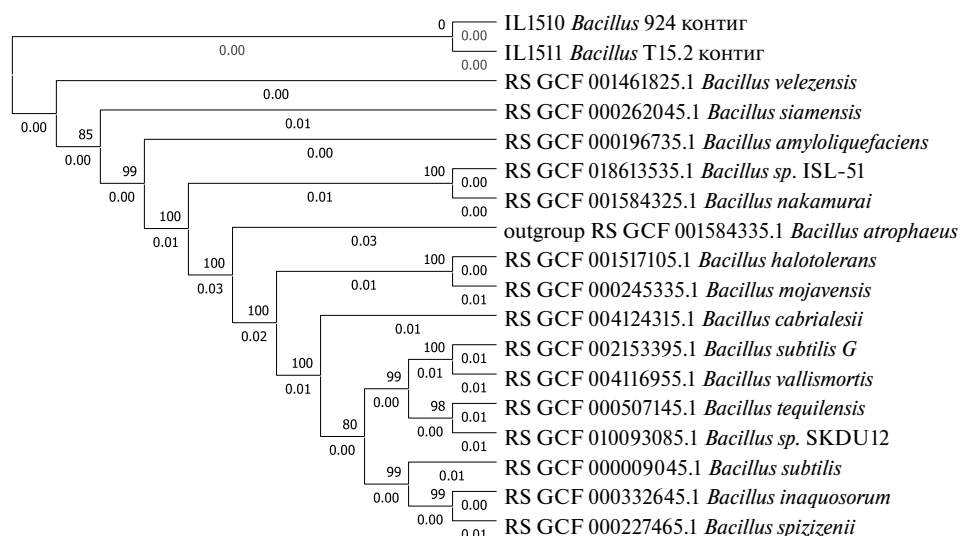




**Рис. 2.** Филогенетическое дерево изучаемых штаммов и родственных ST-типов *B. velezensis*, построенное методом связывания ближайших соседей с использованием слитых нуклеотидных последовательностей генов домашнего хозяйства. Эволюционные расстояния представлены в единицах количества замен оснований на сайт.

**Таблица 5.** Видовая идентификация штаммов 924 и T15.2 с использованием анализа нуклеотидных последовательностей генов домашнего хозяйства

Вид	Штамм	ST	<i>glpF</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pusA</i>	<i>rpoD</i>	<i>tpiA</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	LFB112	71	29	—	54	50	51	30	—
	M27	95	29	62	54	50	—	30	—
	NBRC 3025	170	29	—	54	50	—	30	77
	T15.2/ 924	—	29	62	54	50	51	30	77



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа 120 маркерных генов с использованием базы данных Genome Taxonomy Database. Дерево построено методом связывания ближайших соседей. Эволюционные расстояния представлены в единицах количества замен оснований на сайт.

**Уточнение таксономической принадлежности**

На основании биохимических характеристик и системы автоматизированной идентификации микробных штаммов Vitek-60 (“BioMerieux”, Франция), использованные в работе штаммы были первоначально идентифицированы как представители вида *B. subtilis*. Таксономическую принадлежность уточняли при помощи гMLST-анализа 53 генов *rps*, кодирующих белки бактериальных рибосомных субъединиц (см. Дополнительные материалы 1, 2), и 120 маркерных генов с использованием базы данных Genome Taxonomy Database (рис. 3) [23]. Результаты этих анализов показали, что штаммы *Bacillus* 924 и *Bacillus* T15.2 относятся к виду *B. velezensis*, который в 2005 году впервые был классифицирован как новый вид, входящий в группу *B. amyloliquefaciens* в составе группы *B. subtilis*. Типовой штамм (CR-502Т=СЕСТ 5686Т=LMG 22478Т) был выделен из пробы воды, взятой из реки Веллес в Малаге на юге Испании [24].

Аллельный профиль семи генов домашнего хозяйства изучаемых штаммов также указывает на их принадлежность к виду *B. velezensis* (табл. 5), а проведенный филогенетический анализ выявил тесную связь с 13 ST-типами этого вида (рис. 2).

Анализ драфт-геномов на сайте <http://microbial-genomes.org/> также позволяет отнести наши штаммы к виду *B. velezensis* с наибольшей идентичностью геномов штаммов T15.2 и *B. velezensis* NZ CP031424 (99.33%), а также штамма 924 с *B. velezensis* NZ CP029473 (99.63%) (табл. 6).

**Таблица 6.** Идентификация штаммов на основании идентичности геномных нуклеотидных последовательностей

Штамм	Средняя нуклеотидная идентичность (ANI, %)		Покрытие, %	
	T15.2	924	T15.2	924
<i>Bacillus</i> sp. ZY 1 1 NZ CP027061	99.26	99.94	91.7	97.87
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP029473	99.26	99.63	94.74	96.57
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NZ CP017953	99.25	99.5	95.2	95.81
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP010556	99.32	99.34	94.82	94.52
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP031424	99.33	99.34	94.44	94.44
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NZ CP013727	99.31	99.34	96.19	95.89
<i>Bacillus subtilis</i> NZ CP009684	99.31	99.32	95.28	95.05
<i>Bacillus velezensis</i> NZ LN999829	99.31	99.31	94.82	94.74
<i>Bacillus velezensis</i> CP072310	99.30	99.31	94.67	94.82
<i>Bacillus velezensis</i> CAU B946 NC 016784	99.31	99.3	95.66	95.81
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP031880	99.31	99.3	94.90	95.05

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экстремальные условия космического пространства оказывают комплексное негативное воздействие на клеточные структуры микроорганизмов, но живые организмы имеют ряд стратегий выживания, которые играют важную роль в поддержании целостности клеточных структур и молекул ДНК в условиях воздействия негативных экологических факторов.

В ходе изучения влияния космической среды на молекулярные структуры спорообразующих бактерий *B. velezensis* мы сравнили полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов T15.2 и 924 (наземный контрольный референсный штамм) и выявили 99.98% идентичности, что указывает на возможность сохранения высокой стабильности генома после длительного пребывания во внесемных условиях, обусловленной действием механизмов защиты бактериальных клеточных структур и работой эффективной системы репарации.

Известно, что бактерии рода *Bacillus* способны предотвращать возникновение повреждений или эффективно восстанавливать клеточные структуры после негативного воздействия. Пути защиты спор от многих стресс-факторов включают: резкое снижение количества воды в клетке, уплотнение и утолщение оболочки споры, значительное накопление пиридин-2,6-дикарбоновой (дипиколиновой) кислоты (DPA), повышение уровня малых кислоторастворимых белков спор  $\alpha/\beta$ -типа (SASP) концентрацию меланиноподобных пигментов [25–27]. Восстановление накопленных повреждений осуществляется при участии систем устранения окислительного стресса (каталаза, супероксид-дисмутаза), а также таких путей репарации ДНК, как гомологичная и нехомологичная рекомбинация, эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), сканирование целостности ДНК, репарация межцепочечных поперечных связей, эксцизионная репарация оснований (BER), репарация SP-лиазой фотопродуктов спор (Spl) [28, 29].

В ходе уточнения систематического положения штамма 924 и его производного T15.2 установлено, что идентичность нуклеотидных последовательностей геномов этих штаммов и большого количества геномов штаммов вида *B. velezensis*, депонированных в базу данных, превышает 99% (часть штаммов представлена в табл. 6), что может свидетельствовать о возможном занесении штамма 924 на МКС с Земли в результате деятельности человека, при транспортировке грузов, оборудования и т.д. Отличительной особенностью изучаемых штаммов является их аллельный профиль, так как на основе комбинаций номеров аллелей используемых

локусов не удалось определить принадлежность этих штаммов ни к одному из ST-типов, представленных в базе данных.

Сравнение нуклеотидных последовательностей штаммов *B. velezensis* T15.2 и референсного штамма выявило девять точечных замен, три из которых локализованы в межгенных областях и шесть в последовательностях, кодирующих белки, три гена несут миссенс-мутацию, приводящую к замене аминокислотного остатка, и две делеции нуклеотидов, результат которой – сдвиг рамки считывания. В частности, мутации обнаружены в генах ферментов, участвующих в биосинтезе глутамата, цикле трикарбоновых кислот, в гене оксидоредуктазы, катализирующей окисление спирта до ацетальдегида, а также в генетических детерминантах белка-переносчика липопротеинов наружной мембраны и регуляторного белка. Выявленные мутации не повлияли на жизнеспособность бактериальных клеток. Это можно объяснить тем, что многие гены, контролирующие ферменты клеточного метаболизма, присутствуют в нескольких копиях, например ген алкогольдегидрогеназы, или клетка может переключаться на другие пути метаболизма. Некоторые мутации могут быть позитивными для клетки. Так, изменение в гене регуляторной системы может приводить к активации защитных механизмов, направленных на борьбу с устранением последствий воздействия космических факторов. Белок LolA является специфичным шапероном граммотрицательных бактерий, который переносит липопротеины от внутренней мембраны к внешней. У бактерий рода *Bacillus* этот белок высокоомологичен белку YdcC, участвующему в спорообразовании. Возможно, мутация в этом белке может способствовать защите бактериальных спор путем формирования более плотных споровых покрытий. Для более точного понимания влияния обнаруженных мутаций на свойства *B. velezensis* требуются дополнительные исследования.

Опубликованы также сведения о точечных мутациях, обнаруженных в геноме цианобактерии *Nostoc* sp. СССryo 231-06 после 23-месячного пребывания на МКС. Показана повышенная частота синонимичных замен в наиболее измененных локусах, связанных с формированием биопленок и функционированием фотосистемы [30].

Воздействие экстремальных условий, присутствующих на низкой околоземной орбите, негативно влияет на многие клеточные структуры, особенно на нуклеиновые кислоты – в структуре ДНК возникают одно- и двухцепочечные разрывы, накапливаются бипиримидиновые фотопродукты [31]. В нашем эксперименте “Тест-экспонат” выжившие клетки могли быть

экранированы волокнами ватного тампона или верхними слоями бактериальных спор, что могло защитить их от такого наиболее губительно-го космического фактора, как УФ-излучение. Повреждения в структуре ДНК, вызванные совместным воздействием стресс-факторов космического пространства, в большей степени могли быть восстановлены клеткой в результате эффективной работы систем репарации и ферментативного комплекса защиты от окислительного стресса. Это предположение подтверждают и результаты ряда работ, описывающих протеомные, транскриптомные и метаболические изменения, возникающие в клетке в ответ на стресс, вызванный влиянием космических условий [6–8, 32]. В клетках радиационно-устойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans*, чтобы справиться с повреждением ДНК, индуцируется механизм эксцизионной репарации с участием эндонуклеазы UvrABC. Защита от активных форм кислорода связана с повышенным содержанием каталазы и путресцина, который действует как молекула, удаляющая активные формы кислорода. Повышенное содержание белков и мРНК, ответственных за регуляторные и транспортные функции, снижение первичных метаболитов указывает на изменение энергетического статуса, необходимого для восстановления поврежденных молекул [6]. Протеомный анализ вегетативных клеток первого пассажи *B. pumilus* SAFR-032 выявил различия в синтезе ряда белков. Отмечено снижение содержания белков, участвующих в транспорте/метаболизме углеводов и выработке/преобразовании энергии, повышение количества белков, связанных с выживанием, ростом и реакцией на стресс [32]. Транскриптомный анализ клеток *B. subtilis* 168 после 1.5-летнего воздействия космических факторов выявил повышение уровня транскриптов ряда связанных со стрессом генов, реагирующих на повреждение ДНК (SOS-реакция, индукция профага SPβ), повреждение белков (система CtsR/Ctp), окислительный стресс (регулон PerR) и стресс клеточной оболочки (регулон SigV) [7]. Аналогичные результаты получены и при проведении сравнительного протеомного анализа клеток *B. pumilus* SAFR-032 после 18 мес. пребывания в космосе [8].

Важной задачей остается изучение влияния стресс-факторов космического пространства на стабильность генома не только покоящихся спор, но и в условиях метаболической активности клеток бактерий, позволяющее проследить накопление изменений в структуре ДНК и эффективность репарации в ряду поколений. Работы в этом направлении привели к созданию автоматизированной миниатюрной системы для оценки экспрессии генов *in situ* в микробных образцах, которая может использоваться при проведении биологических исследований на космических платформах [33].

Причины выявленных изменений и их влияние на эволюционный потенциал и адаптацию бактерий к условиям космического пространства требуют дальнейшего изучения. Отсутствие крупных перестроек генома позволяет предполагать достаточно высокую стабильность генома микроорганизмов в условиях длительного экспонирования в открытом космосе.

Полученные нами данные важны для решения проблем защиты планеты при планировании межпланетных экспедиций с целью поиска жизни, вероятности панспермии, а также использования микробных технологий для освоения человеком космического пространства. Важной задачей планетарной защиты является предотвращение связанного с космическими полетами биологического загрязнения космических тел земными биологическими структурами, которые могут поставить под сомнение эксперименты по поиску жизни, ее предшественников и остатков [34]. Наши данные подтверждают возможность длительного сохранения жизнеспособности бактериальных спор и целостности их генома во внеземных условиях, что предполагает вероятность переноса спорных форм на другие планеты.

Таким образом, нами подтверждено, что спорообразующие бактерии обладают уникальной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая агрессивные факторы космического пространства. Показана способность микроорганизмов сохранять стабильность генома в условиях космоса, что обусловлено как повышенной стрессоустойчивостью спор бактерий, так и эффективной работой систем репарации накопленных изменений.

Работа выполнена в рамках программы “МКС (Наука) (Наука-1) Тест\_22” и контракта от № 2123730201782217000241851/22-12-640/(15–07001-2002)-07001/75–2022.

Представленная работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Horneck G., Klaus D.M., Rocco L. (2010) Space Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 121–156.
2. Horneck G., Bucker H., Reitz G. (1994) Long-term survival of bacteria spores in space. *Adv. Space Res.* **14**, 41–45.
3. Rabbow E., Rettberg P., Barczyk S., Bohmeier M., Parpart A., Panitz C., Horneck G., Burfeindt J., Molter F., Jaramillo F. (2015) The astrobiological

- mission EXPOSE-R on board of the International Space Station. *Int. J. Astrobiol.* **14**, 3–16.
4. Баранов И.М., Новикова Н.Д., Поликарпов Н.А., Сычев В.Н., Левинских М.А., Алексеев В.Р., Окуда Т., Сугимото М., Гусев О.А., Григорьев А.И. (2009) Эксперимент “Биориск”: 13-месячная экспозиция покоящихся форм организмов на внешней стороне Российского сегмента Международной космической станции (предварительные результаты). *Доклады РАН.* **426**, 206–209.
  5. de La Torre R., Sancho L.G., Horneck G., de los Ríos A., Wierzchos J., Olsson-Francis K., Cockell C.S., Rettberg P., Berger T., de Vera J.P.P., Ott S., Frías J.M., Melendi P.G., Lucas M.M., Reina M., Pintado A., Demets R. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus.* **208**(2), 735–748.
  6. Ott E., Kawaguchi Y., Kölbl D., Rabbow E., Rettberg P., Mora M., Moissl-Eichinger C., Weckwerth W., Yamagishi A., Milojevic T. (2020) Molecular repertoire of *Deinococcus radiodurans* after 1 year of exposure outside the International Space Station within the Tanpopo mission. *Microbiome.* **8**(1), 150.
  7. Nicholson W.L., Moeller R., Horneck G. (2012) Transcriptomic responses of germinating *Bacillus subtilis* spores exposed to 1.5 years of space and simulated martian conditions on the EXPOSE-E experiment PROTECT. *Astrobiology.* **12**(5), 469–486.
  8. Vaishampayan P.A., Rabbow E., Horneck G., Venkateswaran K.J. (2012) Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology.* **12**(5), 487–497.
  9. Mastroleo F., Van Houdt R., Leroy B., Benotmane M.A., Janssen A., Mergeay M., Vanhavere F., Hendrickx L., Wattiez R., Leys N. (2009) Experimental design and environmental parameters affect *Rhodospirillum rubrum* S1H response to space flight. *ISME J.* **3**(12), 1402–1419.
  10. Wilson J.W., Ott C.M., Honer zu Bentrup K., Ramamurthy R., Quick L., Porwollik S., Cheng P., McClelland M., Tsapraillis G., Radabaugh T., Hunt A., Fernandez D., Richter E., Shah M., Kilcoyne M., Joshi L., Nelman-Gonzalez M., Hing S., Parra M., Dumars P., Norwood K., Bober R., Devich, J. Ruggles A., Goulart C., Rupert M., Stodieck L., Stafford P., Catella L., Schurr M.J., Buchanan K., Morici L., McCracken J., Allen P., Baker-Coleman C., Hammond T., Vogel J., Nelson R., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper H.M., Nickerson C.A. (2007) Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(41), 16299–16304.
  11. Klaus D.M., Howard H.N. (2006) Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight. *Trends Biotechnol.* **24**, 131–136.
  12. Su L., Chang D., Liu C. (2013) The development of space microbiology in the future: the value and significance of space microbiology research. *Future Microbiol.* **8**, 5–8.
  13. Ошуркова В.И., Дешева Е.А., Сузина Н.Е., Шубралова Е.В., Щербакова В.А. (2021) Метаногенные археи в условиях космоса. *Авиакосмическая и экологическая медицина.* **55**(1), 63–69.
  14. Deshevaya E.A., Shubralova E.V., Fialkina S.V., Guridov A.A., Novikova N.D., Tsygankov O.S., Lianko P.S., Orlov O.I., Morzunov S.P., Rizvanov A.A., Nikolaeva I.V. (2020) Microbiological investigation of the space dust collected from the external surfaces of the international space station. *BioNanoScience.* **10**, 81–88.
  15. Magoc T., Salzberg S. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* **27**(21), 2957–2963.
  16. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Zagnitko O. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* **9**, 75.
  17. Langdon W.B. (2015) Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min.* **8**, 1.
  18. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**(5), 455–477.
  19. Liang Q., Liu C., Xu R., Song M., Zhou Z., Li H., Dai W., Yang M., Yu Y., Chen H. (2021) fIDBAC: a platform for fast bacterial genome identification and typing. *Front. Microbiol.* **18**, 723577.
  20. Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
  21. Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021) MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 3022–3027.
  22. Jolley K.A., Bliss C.M., Bennett J.S., Bratcher H.B., Brehony C., Colles F.M., Wimalaratna H., Harrison O.B., Sheppard S.K., Cody A.J., Maiden M.C.J. (2012) Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* (Reading). **158**(Pt 4), 1005–1015.
  23. Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. (2019) GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics.* **36**(6), 1925–1927.
  24. Ruiz-García C., Béjar V., Martínez-Checa F., Llamas I., Quesada E. (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**(Pt 1), 191–195.
  25. Moeller R., Setlow P., Horneck G., Berger T., Reitz G., Rettberg P., Doherty A.J., Okayasu R., Nich-

- olson W.L. (2008) Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from X rays and high-energy charged-particle bombardment. *J. Bacteriol.* **190**, 1134–1140.
26. Moeller R., Reitz G., Berger T., Okayasu R., Nicholson W.L., Horneck G. (2010) Astrobiological aspects of the mutagenesis of cosmic radiation on bacterial spores. *Astrobiology*. **10**(5), 509–521.
27. Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**, 5426–5430.
28. Lenhart J.S., Schroeder J.W., Walsh B.W., Simmons L.A. (2012) DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 530–564.
29. Rebeil R., Sun Y., Chooback L., Pedraza-Reyes M., Kinsland C., Begley T.P., Nicholson W.L. (1998) Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases. *J. Bacteriol.* **180**, 4879–4885.
30. Liu Y., Jeraldo P., Herbert W., McDonough S., Eckloff B., de Vera J.P., Cockell C., Leya T., Baqué M., Jen J., Schulze-Makuch D., Walther-Antonio M. (2022) Non-random genetic alterations in the cyanobacterium *Nostoc* sp. exposed to space conditions. *Sci. Rep.* **12**(1), 12580.
31. Setlow P. (2014) Spore resistance properties. *Microbiol. Spectr.* **2**(5), TBS-0003-2012.
32. Chiang A.J., Mohan G.B.M., Singh N.K., Vaishampayan P.A., Kalkum M., Venkateswaran K. (2019) Alteration of proteomes in first-generation cultures of *Bacillus pumilus* spores exposed to outer space. *mSystems*. **4**(4), e00195-19. doi: <https://doi.org/10.1128/msystems.00195-19>
33. Peyvan K., Karouia F., Cooper J.J., Chamberlain J., Suciú D., Slota M., Pohorille A. (2019) Gene expression measurement module (GEMM) for space application: design and validation. *Life Sci. Space Res.* **22**, 55–67.
34. Olsson-Francis K., Doran P.T., Ilyin V., Raulin F., Rettberg P., Kminek G., Mier M.Z., Coustenis A., Hedman N., Shehhi O.A., Ammannito E., Bernardini J., Fujimoto M., Grasset O., Groen F., Hayes A., Gallagher S., Kumar K.P., Mustin C., Nakamura A., Seasley E., Suzuki Y., Peng J., Prieto-Ballesteros O., Sinibaldi S., Xu K., Zaitsev M. (2023) The COSPAR planetary protection policy for robotic missions to Mars: a review of current scientific knowledge and future perspectives. *Life Sci. Space Res. (Amst)*. **36**, 27–35.

## Genome Stability of *Bacillus velezensis* after Two-Year Exposure in Open Space

S. V. Fialkina<sup>1, 2, \*</sup>, E. A. Dshevaya<sup>1</sup>, A. L. Rakitin<sup>3</sup>, and O. I. Orlov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Problems, Moscow, 123007 Russia

<sup>2</sup> Gamaleya Research Centre, Moscow, 123098 Russia

<sup>3</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: [fialkina-fsv@mail.ru](mailto:fialkina-fsv@mail.ru)

Spore-forming bacteria have a unique resistance to negative environmental conditions, including aggressive space factors, and are an excellent model for studying adaptation mechanisms and survival strategies at the molecular level. The study analyzed the genome of *Bacillus velezensis*, which remained viable after a two-year exposure in outer space on the outer surface of the ISS as part of the Test space experiment. A comparative analysis of the draft genomes of the exhibit strain and the ground control did not reveal significant changes, the average nucleotide identity was 99.98%, which indicates the ability of microorganisms to maintain genome stability in space conditions, due to both increased stress resistance of bacterial spores and efficient operation of the system. repair of accumulated changes. The study of single nucleotide polymorphism in the genome of *Bacillus velezensis* revealed nine point substitutions, three of which are in intergenic regions, 6 in protein-coding genes, three of them are missense mutations, two nucleotide deletions leading to a shift in the reading frame, and one synonymous substitution. The profiles of the housekeeping genes were determined during MLST typing, and it was found that the allelic profiles obtained for *B. velezensis* T15.2 and 924 strains do not correspond to any of the previously described sequence types. The presented results indicate the ability of *Bacillus velezensis* bacteria to maintain the viability of spores and the integrity of the genome for a long time under extreme conditions of outer space, which is important for the problem of planetary protection, as well as the potential possibility of implementing biotechnological processes based on *Bacillus velezensis* during space exploration.

**Keywords:** space experiment “Test”, *Bacillus velezensis*, impact of cosmic factors, low earth orbit, bacterial spores, international space station

УДК 575.113

## СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ ДНК-ТРАНСПОЗОНОВ НАДСЕМЕЙСТВА *L31* ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

© 2024 г. М. В. Пузаков<sup>а</sup>, \*, Л. В. Пузакова<sup>а</sup><sup>а</sup> Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского” Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

\*e-mail: puzakov@ngs.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 09.06.2023 г.

Принята к публикации 09.06.2023 г.

Мобильные генетические элементы *IS630/Tc1/mariner* (*ITm*) являются широко распространенными представителями ДНК-транспозонов, вносящих значительный вклад в эволюцию геномов эукариот. Масштабное применение технологий секвенирования нового поколения (NGS) привело к появлению множества полногеномных нуклеотидных последовательностей новых организмов и выявлению элементов *ITm* в большинстве таксонов эукариот. Несмотря на достаточно детальную изученность разнообразия *ITm*, по-прежнему обнаруживаются элементы, которые способствуют расширению и пересмотру классификации этой группы ДНК-транспозонов. В представленной работе впервые проведен детальный анализ элементов *L31* двустворчатых моллюсков, что позволило описать структуру, разнообразие, распространение и филогенетическое положение этих элементов в группе *ITm*. Установлено, что *L31*-транспозоны являются самостоятельным надсемейством в группе *ITm*, имеющим древнее происхождение. Внутри клады *L31* наблюдается достаточно высокое разнообразие – выделено пять филогенетических кластеров. На данный момент *L31*-транспозоны у двустворчатых моллюсков выявлены только в подклассе *Autobranchia* с преобладанием по разнообразию и количеству в инфраклассе *Pteriomorpha*. Показано также, что белок, кодируемый второй открытой рамкой считывания, является неотъемлемым структурным компонентом практически всех полноразмерных элементов *L31*. Полученные данные способствуют лучшему пониманию эволюции представителей *ITm*-транспозонов. Дальнейшее изучение *L31*-транспозонов в других таксонах (стрекающие), а также исследование функции белка, кодируемого второй рамкой считывания, позволит лучше понять эволюцию ДНК-транспозонов, механизмы их горизонтального переноса и вклад в биоразнообразие эукариот.

**Ключевые слова:** ДНК-транспозоны, *L31*-транспозоны, двустворчатые моллюски, эволюция геномов, биоразнообразие

**DOI:** 10.31857/S0026898424010051, **EDN:** OFVSWF

### ВВЕДЕНИЕ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) эукариот – это подвижные элементы, которые существуют и эволюционируют внутри геномов хозяев, перемещаясь из локуса в локус, а также способны к горизонтальному переносу между геномами. МГЭ широко распространены в геномах прокариот и эукариот [1–4]. После вторжения в геном хозяина МГЭ способны увеличивать число своих копий, зачастую очень значительно. Из-за способности к транспозиции и частой амплификации транспозоны являются основными детерминантами размера генома [1, 2, 5, 6]. Активные перемещения и амплификация МГЭ способны изменять первичную структуру ДНК, влиять на работу генов и их функцию, вмешиваться

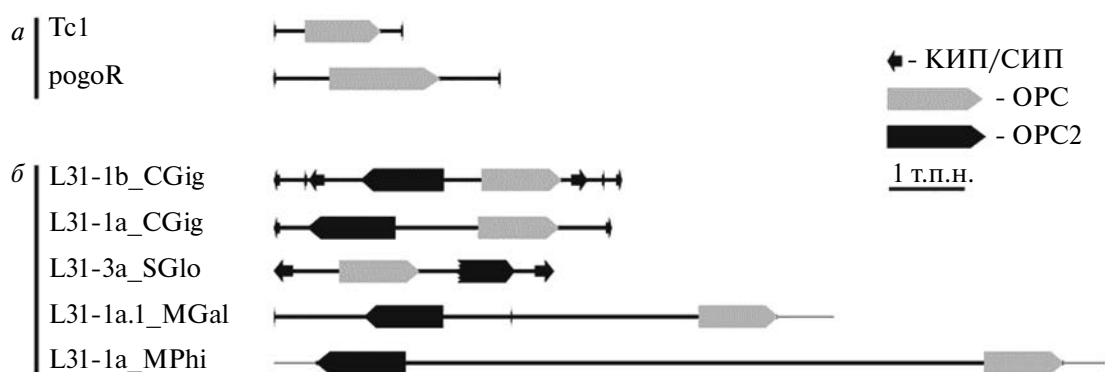
в процессы регуляции транскрипции, вызывать хромосомные aberrации в геноме хозяина [7–9]. Любопытно, что, внедряясь в геном хозяина, МГЭ не просто хаотично перемещаются, как считалось ранее, а способны “выбирать” наиболее предпочтительные для себя локусы генома [10]. В геноме хозяина МГЭ проходят определенные стадии жизненного цикла, результатами которого, как правило, являются постепенная деградация и элиминация [11–13]. Однако некоторые МГЭ могут существовать в геноме хозяина достаточно долго при большом количестве функциональных копий, например ретротранспозоны *LINE-1* млекопитающих [14, 15]. Кроме того, МГЭ могут избежать исчезновения, став источником новых генов или других полезных для генома структур [2]. На данный

момент выявлен целый ряд структурных и регуляторных генов, возникших в результате молекулярного одомашнивания МГЭ [16]. Также жизненный цикл МГЭ можно перезапустить посредством горизонтального переноса в геном другого хозяина (явление горизонтального переноса ряда элементов, например SINE, не описано) [2, 3, 11].

Другой важный аспект – это способность МГЭ отвечать активностью на некоторые стрессовые физические, химические и биологические факторы [17–22]. Индукция активности МГЭ выражается в увеличении частоты перемещений и, соответственно, усилении амплификации. Все это, в свою очередь, дестабилизирует геном хозяина, приводя к повышению частоты мутаций и гибели организма, а в редких случаях – к их адаптации и дальнейшей эволюции [7, 23, 24]. В соответствии с классификацией МГЭ эукариот делят на два класса: класс I – ретротранспозоны; класс II – ДНК-транспозоны. Деление на классы опирается на механизм пе-

ремещения, свойственный каждому из них. Ретротранспозоны перемещаются через создание РНК-посредника. ДНК-транспозоны не создают себе посредника и напрямую вырезаются из геномной последовательности и встраиваются в нее [25–27].

ДНК-транспозоны – очень разнообразная и многочисленная группа МГЭ, включающая три подкласса и не менее 17 надсемейств [26, 28]. Одной из широко распространенных групп ДНК-транспозонов эукариот является инфракласс *ITm* [29, 30], включающий несколько надсемейств: *pogo*, *Tc1/mariner*, *Gambol*, *Sailor* [29, 31–34]. Автономные транспозоны *ITm* содержат, как правило, одну открытую рамку считывания (ОРС), которая кодирует фермент транспозазу и окружена концевыми инвертированными повторами (КИП). Встречаются элементы, имеющие более одной пары инвертированных повторов. Дополнительные повторы обычно называют субконцевыми инвертированными повторами (СИП) (рис. 1а) [27, 32].



**Рис. 1.** Структура транспозонов суперсемейств *Tc1/mariner* и *pogo* (а) и разнообразие структуры *L31*-элементов двустворчатых моллюсков (б). КИП/СИП – концевые инвертированные повторы или субконцевые инвертированные повторы; ОРС – открытая рамка считывания, кодирующая транспозазу; ОРС2 – открытая рамка считывания, кодирующая белок с неизвестной функцией.

В ходе исследования разнообразия элементов *ITm* в геноме тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* был описан транспозон *Mariner-31\_CGi* – представитель неизвестной обособленной группы, условно названной *L31* (от like *Mariner-31\_CGi*) [35]. На филогенетическом дереве данная группа заняла место вне известных крупных надсемейств *Tc1/mariner* и *pogo*. ОРС представителей *L31* кодировала транспозазу с каталитическим доменом DD37E. При этом в последовательности элемента *Mariner-31\_CGi* присутствовала еще одна ОРС, кодирующая белок с неизвестной функцией. Детальное изучение представителей данной группы не входило в задачи работы, поэтому исследователи ограничились только анализом распространенности элементов *L31* среди эукариот. На основании данных о наличии гомологий с транспозазой *Mariner-31\_CGi*

представители *L31* были найдены только у двух таксонов: двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) и стрекающих (*Cnidaria*) [35].

Позднее в работе, посвященной глубокому анализу филогенетических отношений и классификации элементов *ITm*, представители *L31* были отнесены к так называемым минорным группам [30]. При этом высказывались сомнения в принадлежности элемента *Mariner-31\_CGi* к *L31*, который, собственно, и был референсным для данной группы. Кроме того, изучение структурных особенностей и эволюции элементов *L31* не входило в задачи работы. Таким образом, группа *L31* оставалась практически неизученной.

В данной работе представлен первый детальный анализ элементов *L31* у двустворча-



тых моллюсков, в результате которого описаны структура, разнообразие и распространенность, а также установлено филогенетическое положение транспозонов *L31* в инфраклассе *ITm*. Показано также, что белок, кодируемый *OPC2*, является неотъемлемым структурным компонентом практически всех полноразмерных элементов *L31*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Поиск элементов.** В качестве образца для поиска элементов *L31* использовали объединенную аминокислотную последовательность транспозазы и белка, кодируемого *OPC2* (Дополнительные материалы 1), принадлежащих описанному ранее элементу *Mariner-31\_CGi* устрицы *Crassostrea gigas* [35], взятые из базы данных Repbase (<https://www.girinst.org/>). Полногеномные нуклеотидные последовательности представителей двустворчатых получены из базы данных NCBI Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). Поиск полноразмерных элементов *L31* осуществляли с помощью tBLASTn [36] по гомологии с образцом, представленным в полногеномных последовательностях двустворчатых. При анализе обнаруженных гомологий мы учитывали последовательности с процентом соответствия образцу по длине (Query Coverage) 45 и более. Далее из оставшегося многообразия мы выбирали все последовательности, кодирующие потенциально функциональную транспозазу (с доменом DD37E) и потенциально функциональный белок *OPC2*. Критериями для оценки потенциальной функциональности транспозаз и белков *OPC2* были: неповрежденная *OPC*, наличие стартового кодона и стоп-кодона, а для транспозаз еще и длина, составляющая не менее 340 аминокислотных остатков (а.о.). Если таковых не было, то выбирали наиболее сохранившиеся последовательности. В тех случаях, когда последовательность, гомологичная образцу, кодировала потенциально функциональный белок *OPC2*, но не кодировала потенциально функциональную транспозазу, мы также анализировали ее как предполагаемый элемент *L31*. За допустимое расстояние между белком *OPC2* и транспозазой внутри предполагаемого элемента мы приняли 10 000 п.н. При большем расстоянии белок *OPC2* и транспозазу считали принадлежащими разным элементам или разным копиям одного элемента.

При поиске копий потенциально функциональных транспозаз для каждого обнаруженного элемента в качестве образца брали аминокислотную последовательность неповрежденной транспозазы этого элемента и осуществляли поиск в tBLASTn с настройками фильтров: Query Coverage 99-100 и Percent Identity 90-100. Сре-

ди результатов поиска при подсчете учитывали только те транспозазы, идентичность которых составляет не менее 90%, а соответствие образцу по длине не менее 99% (Query Coverage), которые имеют такой же домен, как у образца (например, DNLSAH), а также неповрежденную *OPC* со стартовым кодоном и стоп-кодоном. При поиске потенциально функциональных копий каждого обнаруженного белка *OPC2* мы брали в качестве образца последовательность этого белка. Поиск копий осуществляли в tBLASTn с настройками фильтров: Query Coverage 99-100, при подсчете учитывали только копии без внутренних стоп-кодонов.

КИП обнаруживали с помощью BLASTn путем анализа нуклеотидных последовательностей [36]. Границы гипотетических *OPC* определяли с помощью ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) и далее уточняли визуально.

**Филогенетический анализ.** Для филогенетического анализа были взяты *L31*-транспозазы двустворчатых моллюсков, описанные в данной исследовании, а также *L31*-транспозазы тихоокеанской устрицы *C. gigas* (*Mariner-31\_CGi* и *Mariner-53\_CGi*) из Repbase и транспозазы элементов, представляющих известные группы инфракласса *ITm* (табл. 1, см. Дополнительные материалы [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Puzakov\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Puzakov_rus.pdf)), в общей сложности 139 аминокислотных последовательностей. Множественное выравнивание проводили с использованием MAFFT с применением метода G-INS-I [37]. Филогенетическое дерево получено с использованием метода максимального правдоподобия в программе IQ-TREE [38] со сверхбыстрым бутстреп-анализом (UFBoot) (1000 повторов) [39], модель LG+F+I+G4 выбрана с помощью ModelFinder [40].

**Анализ доменной структуры транспозазы.** В анализ доменной структуры последовательностей взяты все элементы, имеющие по первичному анализу потенциально функциональные транспозазы (табл. 2). Расположение GRPR-подобного мотива и маркерных аминокислотных остатков: аспартат (D), аспаргат (D) и глутамат (E) каталитического домена идентифицировали визуально по гомологии. ДНК-связывающий домен (три  $\alpha$ -спирали до GRPR-подобного мотива и три после) выявляли, анализируя вторичную структуру транспозазы, предсказанную с помощью программы PSIPRED v4.0 [50]. Предполагаемую последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) определяли с помощью программы PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>). Графическое представление обобщенных последовательностей отдельных участков каталитического домена сгенерировано с помощью WebLogo [51].

Таблица 1. *ITm*-транспозоны, транспозазы которых использовали в филогенетическом анализе

<i>Famar1</i>	AAO12863	<i>Guest_Ca-sativa</i>	XP010462775	
<i>Dmmar1</i>	AAA28678	<i>Guest_Soymar1</i>	AF078934	
<i>Tymar1</i>	AAP45328	<i>Guest_Br-oleracea</i>	XP013589454	
<i>Hsmar1</i>	AAC52010	<i>Guest_Phylostachys_edulis</i>	ADP24264	
<i>Bytmar1</i>	CAD45367	<i>Guest_Pisum_sativum</i>	AAX51974	
<i>Quetzal</i>	AAB02109	<i>Gambol_(AAAB01008815)</i>	AAAB01008815	
<i>Mariner-14_CGi</i>	Repbase	<i>Gambol_(AAAB01008960)</i>	AAAB01008960	
<i>SsTRT</i>	[41]	<i>Gambol_(AAAB01008968)</i>	AAAB01008968	
<i>An-gambiae1</i>	AF378002	<i>Gambol_(AAAB01016702)</i>	AAAB01016702	
<i>In_Rhinella_marina</i>	[42]	<i>Gambol_(AAAB01006894)</i>	AAAB01006894	
<i>DD35E_TR-Xihe</i>	[43]	<i>Gambol_(AAAB01006919)</i>	AAAB01006919	
<i>DD38E_IT_At</i>	[44]	<i>Gambol_(AAAB01008879)</i>	AAAB01008879	
<i>TLEWI-1_BPl</i>	[45]	<i>Gambol_(AAAB01008849)</i>	AAAB01008849	
<i>VS-Maze</i>	[46]	<i>Gambol_(AAAB01008958)</i>	AAAB01008958	
<i>L18-1_HVul</i>	[47]	<i>TBE_AAA18578</i>	[30]	
<i>Z-1_POch</i>		<i>TBE_AAB42017</i>		
<i>Bmmar1</i>	[48]	<i>TBE_AAB42032</i>		
<i>pogoR11</i>	S20478	<i>TBE_AAB49643</i>		
<i>Tigger1</i>	U49973	<i>TBE_AAB49646</i>		
<i>Fot1</i>	Q00832	<i>TBE_AAB58026</i>		
<i>Tan1</i>	U58946	<i>TBE_AAB58028</i>		
<i>Pot2</i>	Z33638	<i>TBE_AAB58030</i>		
<i>pogo-5_PBac</i>	[49]	<i>TBE_AAB58032</i>		
<i>pogo-2_BOva</i>		<i>TBE_AAB58034</i>		
<i>Tec_AAA62601</i>	[30]	<i>TBE_AAB58036</i>		
<i>Tec_AAA91339</i>		<i>TBE_AAB58377</i>		
<i>Tec_AAM80490</i>		<i>TBE_TBE1</i>		
<i>Tec_Tec1</i>		<i>TBE_AAB42034</i>		
<i>Sailor_Mo_Teggra</i>		<i>TBE_EJY78953</i>		
<i>Sailor_Mo_Batpla</i>		<i>TBE_EJY85485</i>		
<i>Sailor_Mo_Cepnem</i>	[29]	<i>IS630Ss</i>		X05955
<i>Sailor_Mo_Cragig</i>		<i>IS630Se</i>		NP_073225
<i>Sailor_Mo_Cycsin</i>		<i>IS630_Citrobacter_braakii</i>		STH95988)
<i>Sailor_Mo_Hallae</i>		<i>IS630_Escherichia_coli</i>		GDW80866)
<i>Sailor_Mo_Halrub</i>		<i>IS630_Shigella_dysenteriae</i>	VDG84061)	
<i>Sailor_Mo_Halruf</i>		<i>IS630_Shigella_flexneri</i>	SRR10263	
<i>Sailor_Mo_Limfor</i>		<i>HvSm_XP_004209659</i>	[30]	
<i>Sailor_Mo_Mermer</i>		<i>HvSm_XP_004212365</i>		
<i>Sailor_Mo_Modphi</i>		<i>HvSm_XP_012557766</i>		
<i>Sailor_Mo_Mytcor</i>			<i>HvSm_M-6_SM</i>	
<i>Sailor_Mo_Pinimb</i>			<i>L31_Mariner-53_CGi</i>	Repbase
<i>Sailor_Mo_Rudphi</i>			<i>L31_Mariner-31_CGi</i>	
<i>Sailor_Mo_Saglo</i>				

**Предсказание функции белка, кодируемого второй ОРС.** Гипотетическую функцию белка, кодируемого второй ОРС, изучали с использованием в качестве референсной аминокислотной последовательности элемента *L31-1b\_CGig* (*C. gigas*) протяженностью 368 а.о. Поиск гомологий с известными консервативными доменами осуществляли с помощью сервиса CDD [52], алгоритма BLAST [53] и программы Dompred [54]. Кроме того, использовали инструменты предсказания функции FFpred 3 [55] и MEMSAT [56] и сервиса предсказания третичной структуры SWISS-MODEL [57].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Эволюционное разнообразие L31-транспозонов двустворчатых*

В результате поиска гомологов *Mariner-31\_CGi* у двустворчатых моллюсков обнаружены 45 уникальных элементов (табл. 2). Для моделирования эволюционных связей проведен филогенетический анализ, в который вошли *L31*-транспозоны двустворчатых, а также представители всех известных групп инфракласса *ITm*. Полученная дендрограмма (рис. 2) была укоренена на элементы *IS630*, которые, как правило, используются в качестве внешней группы при филогенетическом анализе транспозонов *ITm* [25–30, 35].

Установлено, что *L31*-транспозоны формируют единую кладу с высокой достоверностью (бутстреп-значение 100%) (рис. 2). Высокую значимость в сформированных кладах показали и представители надсемейств *Sailor* и *pogo*, а также так называемых минорных групп *Tec* и *TBE*. Элементы *HvSm* создали единую смешанную ветвь с элементами надсемейства *Gambol* со значимостью 99%. В исследовании, в котором элементы *HvSm* выделены в отдельную кладу, элементы *Gambol* не вошли в филогенетический анализ [30], поэтому есть вероятность, что элементы *HvSm* и *Gambol* являются представителями одной эволюционной группы. Представители надсемейства *Tc1/mariner* сформировали кладу с достоверностью 69% (рис. 2), что может указывать на более высокую филогенетическую гетерогенность данной группы или на раннюю дивергенцию элементов внутри группы.

Внутри клады *L31* наблюдалось достаточно высокое разнообразие. Мы выделили пять кластеров с достоверностью от 70 до 100% (рис. 2). В кластерах встречалось более одного элемента, обнаруженного в одной геномной сборке, поэтому в названиях элементов к номерам, соответствующим кластеру, мы добавляли литеры (рис. 2). Каждый кластер отличался по входя-

щим в него представителям отрядов двустворчатых моллюсков. Так, в кластер *L31-1* вошли элементы отрядов *Mytilida* и *Ostreida* с доминирующим преобладанием разнообразия последнего. Десять элементов *Ostreida* распределились в три ветви (a, b и c) и один отдельный элемент *Saccostrea glomerata*, получивший литеру d (*L31-1d\_SGlo*), так как не вошел ни в одну из трех ветвей, упомянутых выше. Также в *L31-1* попали два элемента *C. gigas* из Repbase: *Mariner-31\_CGi* (описанный ранее [35]) и *Mariner-53\_CGi* (не охарактеризованный). Шесть элементов *Mytilida* объединились в единую группу (рис. 2). Кластер *L31-2* сформировали элементы представителей отрядов *Ostreida*, *Mytilida* и *Pectinida*. Здесь наблюдалось преобладание элементов, обнаруженных в геномах *Mytilida*, которые распределились в три ветви. В *L31-3* вошли транспозоны отрядов *Ostreida*, *Mytilida* и *Pterioidea*, а в *L31-4* – элементы отрядов *Mytilida*, *Pterioidea*, *Adapedonta* и *Venerida*. Немногочисленность элементов в кластерах не позволяет выделить явные клады, хотя все же наблюдается группировка элементов в соответствии с таксономией. Кластер *L31-5* включает только два элемента, которые выявлены у представителей отряда *Pectinida* (рис. 2).

### *Распространение L31-транспозонов среди двустворчатых*

На момент исследования в коллекциях NCBI были представлены полногеномные последовательности только двустворчатых подкласса *Autobranchia*, поэтому подкласс *Protobranchia* остался неизученным. В результате анализа распространения элементов *L31* среди двустворчатых подкласса *Autobranchia* установлено, что они преобладают в инфраклассе *Pteriomorphia* (рис. 3). В другом инфраклассе – *Heteroconchia* – только у трех из 17 видов обнаружено по одному достаточно хорошо сохранившемуся *L31*-транспозону (табл. 2). Все три вида принадлежат к субтерклассу *Euheterodonta*: два из отряда *Venerida* и один из *Adaendonta*. Все элементы принадлежат к кластеру *L31-4*. Еще у одного представителя отряда *Venerida* (*Ruditapes philippinarum*) обнаружены короткие фрагменты, гомологичные *Mariner-31\_CGi*. У других видов, принадлежащих отрядам *Venerida* (три вида), *Adapedonta* (один вид), *Myida* (три вида) и *Cardiida* (два вида) субтеркласса *Euheterodonta*, гомологий не выявлено (табл. 2). В другом субтерклассе *Palaeoheterodonta* инфракласса *Heteroconchia* анализ геномных последовательностей четырех представителей отряда *Unionida* выявил в трех из них короткие фрагменты *L31*-транспозонов (табл. 2).

Таблица 2. Элементы L31 двустворчатых моллюсков

Отряд	Идентификатор геномной сборки	Элемент	Длина, п.н. <sup>a</sup>	КИП, п.н. <sup>a</sup>	СИП, п.н. <sup>a</sup>	Транспозаза, а.о. <sup>a</sup>	Белок ОРС2, а.о. <sup>a</sup>	Интервал между ОРС, п.н. <sup>a</sup>	Число копий	Число ПФТ	Число ПФБ-2
Ostreida	<i>Crassostrea ariakensis</i> GCA_020458035	L31-Ia_CAri	4631	85/85	—	359	390	1194	8	2	4
		L31-Ic_CAri	4704	34/34	—	356	385	992	4	3	3
		L31-Ia_CGig	4450	85/85	—	359	390	1086	4	1	2
	<i>Crassostrea gigas</i> GCA_011032805	L31-Ib_CGig	4597	78/76	36/35 209/224	355	368	485	8	2	1
		L31-2a.1_CGig	3686	145/145	—	356	219	676	6	4	0
		L31-2a.2_CGig	3860	145/145	—	356	188	483	6	4	0
	<i>Crassostrea virginica</i> GCA_002022765	L31-Ia_CVir	4127	129/129	—	356	395	719	21	9	5
		L31-Ia.1_CHon	4481	87/87	—	355	387	1106	6	4	4
		L31-Ia.2_CHon	4279	86/86	—	359	390	913	6	4	4
		L31-Ib_CHon	3682	217/203	—	355	368	487	25	2	2
		L31-Ic.1_CHon	2958	31/31	—	356	—	—	10	0	0
		L31-Ic.2_CHon	2912	—	—	364	239	1097	10	0	0
		L31-Ic.3_CHon	2823	—	—	207	383	1047	16	2	0
	<i>Saccostrea glomerata</i> GCA_003671525	L31-2a_CHon	3841	145/145	—	357	126	816	16	2	0
		L31-Ic_SGlo	3400	—	—	361	332	1972	2	0	0
L31-Ic_SGlo		1738	—	—	347	117	343	5	1	0	
L31-2a_SGlo		5552	—	—	354	293	3605	3	0	0	
L31-3a_SGlo		3670	255/254	—	356	252	503	4	0	0	
L31-Ib_OLur		7144	—	—	335	285	5186	1	0	0	
<i>Mytilus coruscus</i> GCA_017311375	L31-Ia_MCor	5859	50/49	—	97	420	2463	2	0	0	
	L31-2a_MCor	1041	—	—	346	—	—	2	0	0	
	L31-Ia_MEdu	4707	22/22**	—	157	370	3126	2	0	0	
	L31-2a_MEdu	6282	31/31	—	358	217	1412	10	3	0	
<i>Mytilus edulis</i> GCA_905397895	L31-2b_MEdu	6357	213/214	—	355	253	2494	8	5	0	
	L31-Ia.1_MGal	5477	23/23**	—	355	355	3341	2	1	1	
	L31-Ia.2_MGal	1278	—	—	—	425	—	6	0	0	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> GCA_900618805	L31-2a_MGal	10181	28/28	—	347	205	1416	6	0	0	
	L31-2b_MGal	9975	77/77	—	355	252	2585	8	1	0	
<i>Gigantidas platifrons</i> GCA_002080005	L31-3a_GPla	13921	—	—	361	101	12527	5	0	0	
	L31-Ia_MCal	7339	32/32	34/36*	352	431	2004	1	0	0	
	L31-2a.1_MCal	5385	30/30	—	358	246	1177	9	2	0	
<i>Mytilus californianus</i> GCA_021869535	L31-2a.2_MCal	5739	27/27	—	252	219	1102	9	2	0	
	L31-2a.3_MCal	590	—	—	195	—	—	—	—	—	

Таблица 2. Продолжение

Отряд	Вид/ Идентификатор геном- ной сборки	Элемент	Дли- на, п.н. <sup>a</sup>	КИП, п.н. <sup>a</sup>	СИП, п.н. <sup>a</sup>	Транспозаза, а.о. <sup>a</sup>	Белок ОРС2, а.о. <sup>a</sup>	Интервал между ОРС, п.н. <sup>a</sup>	Число копий	Число ПФТ	Число ПФБ-2	
	<i>Modiolus philippinarum</i> GCA_002080025	<i>L31-1a_MPhi</i>	9887	—	—	353	397	7631	3	1	1	
		<i>L31-1b_MPhi</i>	4658	—	—	322	291	2563	2	0	0	
		<i>L31-2a_MPhi</i>	1074	—	—	357	—	—	3	1	0	
		<i>L31-2b_MPhi</i>	2207	—	—	363	220	455	4	1	0	
		<i>L31-3a_MPhi</i>	6184	104/104	—	355	169	3342	3	0	0	
		<i>L31-3b_MPhi</i>	2445	—	—	358	169	861	5	0	0	
		<i>L31-4a_MPhi</i>	3403	—	—	357	307	1405	2	1	0	
		Короткие фрагменты										
Pectinida	<i>Limnoretta fortunei</i> GCA_GCA_003130415	Короткие фрагменты										
		<i>L31-2a_PMax</i>	3784	27/27	—	356	215	794	9	4	0	
		<i>L31-2a_AIrr</i>	2343	—	—	359	149	816	6	1	0	
		<i>L31-5_AIrr</i>	1038	—	—	345	—	—	3	2	—	
		<i>L31-5_MYes</i>	969	—	—	323	—	—	6	0	—	
		<i>L31-3a_PImb</i>	2532	31/31	—	357	—	—	3	2	—	
		<i>L31-3b.1_PImb</i>	3908	367/360	—	154	147	1565	2	0	0	
		<i>L31-3b.2_PImb</i>	4433	37/37	342/338	294	196	1067	24	22	20	
Pterioida	<i>Pinctada imbricata</i> GCA_002216045	<i>L31-4a.1_PImb</i>	4456	47/47	—	357	456	428	6	1	0	
		<i>L31-4a.2_PImb</i>	2559	—	—	357	352	426	6	1	0	
		<i>L31-4b_PImb</i>	10108	165/166	—	359	327	4941	10	0	1	
		<i>L31-4c.1_PImb</i>	6923	19/19	197/204	356	—	—	—	—	—	
		<i>L31-4c.2_PImb</i>	4760	237/267	52/52	273	459	490	—	—	—	
		Нет сходства										
		Короткие фрагменты										
		Короткие фрагменты										
Venerida	<i>Mercenaria mercenaria</i> GCF_014805675	<i>L31-4a_MMer</i>	15077	71/71	306/312	348	207	9218	13	9	0	
		<i>L31-4a_CSin</i>	7678	30/30	—	344	212	5515	8	6	0	
	<i>Archivesica marissinica</i> GCA_014843695	Нет сходства										

Таблица 2. Окончание

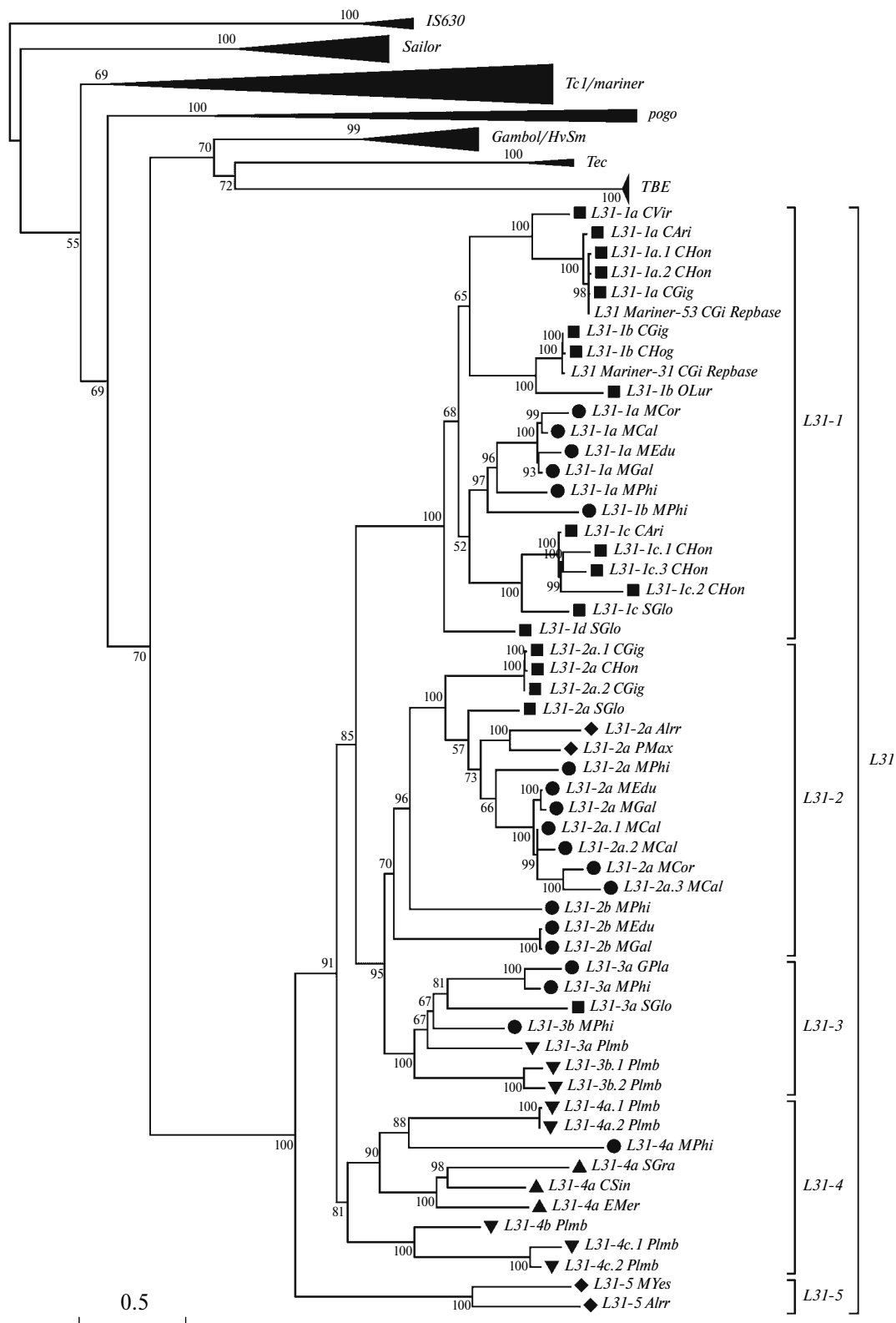
Отряд	Вид/ Идентификатор геном- ной сборки	Элемент	Дли- на, п.н. <sup>а</sup>	КИП, п.н. <sup>а</sup>	СИП, п.н. <sup>а</sup>	Транспозаза, а.о. <sup>а</sup>	Белок ОРС2, а.о. <sup>а</sup>	Интервал между ОРС, п.н. <sup>а</sup>	Число копий	Число ПФТ	Число ПФБ-2
	<i>Ruditapes philippinarum</i> GCA_009026015	Короткие фрагменты									
	<i>Lutaria thunbergiana</i> GCA_008271625	Нет сходства									
	<i>Corbicula fluminea</i> GCA_001632725	Нет сходства									
Adapedonta	<i>Solen grandis</i> GCA_021229015	<i>L31-4a_SGra</i>	959	–	–	314	–	–	1	0	0
	<i>Rapora generosa</i> GCA_902825435	Нет сходства									
	<i>Mya arenaria</i> GCA_922144925	Нет сходства									
Myida	<i>Dreissena polymorpha</i> GCA_020536995 GCA_000806325	Нет сходства									
	<i>Dreissena rostriformis</i> GCA_007657795	Нет сходства									
	<i>Gari tellinella</i> GCA_922989775 GCA_922984925	Нет сходства									
Cardiida	<i>Sinonovacula constricta</i> GCA_009762815 GCA_007844125	Нет сходства									
	<i>Potamilus streckeri</i> GCA_016746295	Короткие фрагменты									
	<i>Megalania nervosa</i> GCA_016617855	Нет сходства									
Unionida	<i>Margaritifera margaritifera</i> GCA_015947965	Короткие фрагменты									
	<i>Venustaconcha ellipsiformis</i> GCA_003401595	Короткие фрагменты									

<sup>а</sup> Приведены данные для репрезентативной копии.

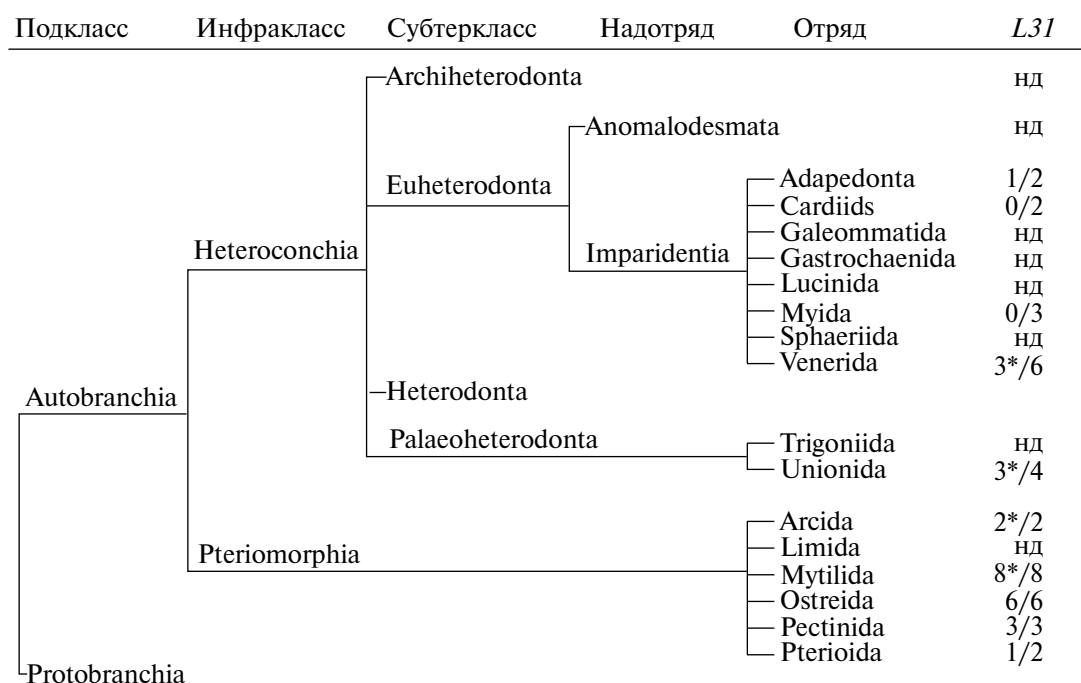
\* Инvertированные повторы фланкируют только ген транспозазы.

\*\* Инvertированные повторы фланкируют только ОРС2.

Условные обозначения: КИП – концевые инvertированные повторы, СИП – субконцевые инvertированные повторы, а.о. – аминокислотный остаток, ОРС – открытая рамка считывания, ПФТ – потенциально функциональная транспозаза; ПФБ-2 – потенциально функциональный белок, кодируемый ОРС2.



**Рис. 2.** Филогенетическое разнообразие *L31*-элементов двустворчатых моллюсков. Названия клад указаны справа от дендрограммы. Геометрическими фигурами обозначены транспозоны, выявленные в данном исследовании: квадрат – отряд *Ostreida*, круг – отряд *Myltilida*, ромб – отряд *Rectinida*, треугольник вершиной вверх – отряды *Adapedonta* и *Venerida*, треугольник вершиной вниз – отряд *Pterioida*. Бустреп-значения менее 50% на дендрограмме не указаны.



**Рис. 3.** Распространение *L31*-транспозонов среди двустворчатых. нд – нет данных; косая черта разделяет количество видов, у которых обнаружены *L31*-элементы, и общее число исследованных видов таксона; \*у некоторых видов выявлены только короткие фрагменты (обрывки) *L31*-элементов (см. текст и табл. 2). Таксономическое дерево создано на основе данных из World Register of Marine Species (WoRMS) (<https://www.marinespecies.org/>) и TimeTree (<http://www.timetree.org/>).

Элементы *L31* выявлены в четырех (Mytilida, Ostreida, Pectinida, Pterioida) из шести отрядов инфракласса Pteriomorphia. У двух видов отряда Arcoida обнаружены только короткие фрагменты, гомологичные *Mariner-31\_CGi*. Полногеномные сборки у представителей Limoida в коллекциях NCBI на момент исследования отсутствовали (табл. 2).

В геномах всех шести изученных видов отряда Ostreida обнаружены элементы *L31*. При этом наблюдалась вариабельность в представленности транспозонов в геномах. Количество уникальных элементов *L31* варьировало от 1 до 4 (табл. 2). Представители кластера *L31-1* выявлены во всех изученных сборках, тогда как элементы *L31-2* найдены у трех организмов, а *L31-3* – только у одного.

У Mytilida *L31*-транспозоны обнаружены у шести из восьми видов. У двух видов (*Limnoperna fortunei* и *Perna viridis*) выявлены только короткие фрагменты элементов *L31*. Вариабельность по количеству уникальных элементов была еще более высокой, чем у Ostreida (от 1 до 7) (табл. 2). У представителей рода *Mytilus* (четыре вида) выявлены элементы кластеров *L31-1* и *L31-2*, тогда как у *Modiolus philippinarum* обнаружены представители четырех кластеров (все, кроме *L31-5*), а у *Gigantidas platifrons* только элемент *L31-3* (табл. 2, табл. 3).

Во всех трех изученных геномах представителей Pectinida присутствовали 1 или 2 элемента *L31* (табл. 2, табл. 3). У гребешка *Pecten maximus* – элемент кластера *L31-2*, а у *Mizuhopecten yessoensis* – *L31-5*. В геноме *Argopecten irradians* обнаружены представители обеих этих групп (*L31-2* и *L31-5*).

В отряде Pterioida анализировали геномные сборки двух видов (табл. 2). Однако *L31*-транспозоны выявлены только у *Pinctada imbricata*. При этом наблюдалось высокое разнообразие: пять уникальных элементов представляли кластеры *L31-3* и *L31-4* (табл. 2, табл. 3).

#### Особенности *L31*-транспозонов двустворчатых

Наиболее яркой чертой элементов *L31* является дополнительная ОРС (ОРС2). Показано, что преобладающее большинство элементов, как и *Mariner-31\_CGi* (*C. gigas*), содержат ОРС2. При этом во всех элементах (за исключением *L31-3a\_SGlo*) ОРС и ОРС2 направлены от центра к краям транспозона, тогда как у *L31-3a\_SGlo* они направлены в одну сторону (рис. 1б). Таким образом, ОРС2 является характерным компонентом элементов *L31*, а не случайным спутником *Mariner-31\_CGi*, как предполагалось ранее [35].



Таблица 3. Характеристика кластеров *L31*-транспозонов двустворчатых

Кластер	Длина <sup>А</sup> , п.н.	КИП, п.н.	СИП, п.н.	Транспозаза, а.о.	Белок ОРС2, а.о.	Интервал между ОРС, п.н.	Число копий	Число ПФТ	Число ПФБ-2	Отряд
<i>L31-1</i>	2958–9887	31–203	35–224	322–364	332–431	343–7631	1–25	0–9	0–4	Ostreida Mytilida
<i>L31-2</i>	3686–10181	27–214	–	345–363	–	455–3605	2–16	0–5	0	Ostreida Mytilida Pectinida
<i>L31-3</i>	2532–13921	31–360	338–342	355–361	–	503–12527	2–5	0–2	0	Ostreida Mytilida Pterioidea
<i>L31-4</i>	4456–15077	19–267	52–312	344–359	327–459	426–9218	1–24	0–22	0–20	Mytilida Pterioidea Adapedonta Venerida
<i>L31-5</i>	969–1038 <sup>Б</sup>	–	–	323–345	–	–	3–6	0–2	0	Pectinida

Примечание. КИП – концевые инвертированные повторы; СИП – субконцевые инвертированные повторы; а.о. – аминокислотный остаток; ОРС – открытая рамка считывания; ПФТ – потенциально функциональная транспозаза; ПФБ-2 – потенциально функциональный белок, кодируемый второй ОРС; А – минимальное значение, указано только для элементов с КИП; Б – у данного кластера нет элементов с КИП, поэтому указана протяженность фрагментов, гомологичных транспозазе.

Наряду с эволюционным разнообразием транспозаз, элементы *L31* также различаются общей протяженностью, длиной КИП и субконцевых инвертированных повторов (СИП) как между кластерами, так и внутри них (табл. 3). Наименьшая протяженность элемента, имеющего КИП (*L31-3a\_PImb*), составляла 2532 п.н., но этот элемент не имел ОРС2. Самый короткий элемент, имеющий КИП и обе ОРС, – *L31-3a\_SGlo*, длина которого составляет 3670 п.н. При этом встречаются элементы, длина которых превышает 10 000 п.н. и даже достигает 15 077 п.н. (*L31-4a\_MMer*). Во всех кластерах, кроме *L31-5*, представлены как короткие, так и длинные варианты. У обоих представителей *L31-5* не сохранились КИП и ОРС2, выявлены лишь последовательности, гомологичные транспозазе (табл. 2, табл. 3).

Флуктуации в протяженности элементов *L31* преимущественно обусловлены длиной межгенного интервала и в меньшей степени длиной КИП, а также наличием и длиной СИП. Во всех кластерах (с обеими ОРС) наблюдается значительный разброс длины межгенного интервала (табл. 3) – от нескольких сотен до нескольких тысяч пар нуклеотидов. Однако у преобладающего числа элементов протяженность этого интервала варьирует в диапазоне от 400 до 2500 п.н., только у отдельных представителей его длина достигает более значительных величин (например, 9218 п.н. у *L31-4a\_MMer* или 12 527 п.н.

у *L31-3a\_GPla*). Причиной такого разнообразия в длине межгенного интервала могут быть мутационные процессы, сопровождающие эволюционный путь *L31*-транспозонов, в результате которых возникают как делеции, так и вставки (иногда протяженные) фрагментов ДНК.

КИП и СИП также демонстрируют разнообразие – от коротких вариантов 19 п.н. (*L31-4c.1\_PImb*) до длинных 367 п.н. (*L31-3b.1\_PImb*). Обобщая полученные данные, можно отметить отсутствие СИП в кластере *L31-2*, при том что он имеет достаточно много представителей (13 элементов). Также есть случаи, когда СИП фланкируют только ген транспозазы (*L31-1a\_MCal*) или единственная пара инвертированных повторов фланкирует только ОРС2 (*L31-1a\_MEdu*, *L31-1a.1\_MGal*) (табл. 2, рис. 1б).

Подсчет копий каждого уникального элемента в геномах двустворчатых показал, что *L31*-транспозоны не имели высокой транскрипционной активности в прошлом. На это указывает немногочисленность сохранившихся экземпляров (табл. 2). Из 45 обнаруженных элементов только три (*L31-1b\_CHon*, *L31-1a\_CVir*, *L31-4a\_PImb*) имели более 20 копий, еще у двух (*L31-4a\_MMer*, *L31-2a\_CHon*) было 13 и 16 копий соответственно. Число копий у остальных *L31*-транспозонов не превышало 10, а у трех элементов (*L31-1b\_OLur*, *L31-1a\_MCal*, *L31-4a\_SGra*) выявлено лишь по одной копии.

Между кластерами больших различий не установлено. В группах *L31-3* и *L31-5* отсутствуют элементы с числом копий, превышающим 10, но и в остальных группах присутствие более многокопийных элементов носит скорее эпизодический характер.

Около половины обнаруженных *L31*-транспозонов (27 элементов) сохранили копии с ОРС, кодирующей потенциально функциональную транспозазу, а только около четверти (11 элементов) – потенциально функциональный белок ОРС2 (табл. 2). Количество копий с интактной ОРС транспозазы не превышало 10, а копий с интактной ОРС2 – пяти. Исключением является *L31-4a*, у которого 22 из 24 копий несли интактный ген транспозазы и 20 из них имели потенциально функциональный ген белка ОРС2.

Полноразмерные транспозазы выявлены во всех кластерах надсемейства *L31* и варьировали от 322 до 364 а.о. В каждом кластере найдены элементы как имеющие копии с потенциально функциональной транспозазой, так и без таковых (табл. 2, табл. 3).

Поскольку белок, кодируемый ОРС2, ранее не был описан, то не установлено, какую длину можно считать характерной для него. В связи с этим мы считали полноразмерными все варианты, превышающие 300 а.о. Копии элементов, содержащие полноразмерные белки ОРС2, выявлены только в кластерах *L31-1* и *L31-4*, хотя в кластерах *L31-2* и *L31-3* также обнаружены элементы с последовательностями, гомологичными ОРС2, но кодирующими белок протяженностью менее 300 а.о. В кластерах *L31-1* и *L31-4* копии с потенциально функциональными белками ОРС2 выявлены не у всех элементов, но у некоторых присутствовали в относительно большом количестве (20 копий у *L31-4a\_PImb*) (табл. 2). Таким образом, можно отметить, что последовательности ОРС2 в большей степени подвержены деградации и элиминации.

#### Доменная структура транспозазы *L31*-транспозонов двустворчатых

Основными компонентами функциональных транспозаз элементов инфракласса *ITm* являются ДНК-связывающий и каталитический (DDE/D) домены [32]. ДНК-связывающий домен расположен в первой половине (N-концевой части) аминокислотной последовательности транспозазы и выявляется по наличию шести  $\alpha$ -спиралей. Этот домен обеспечивает связывание транспозазы с КИП. Между первой и второй триадами  $\alpha$ -спиралей располагается GRPR-подобный мотив. Этот компонент обеспечивает взаимодействие ДНК-связывающего домена с сайтом-мишенью (динуклеотид ТА) [58]. Вто-

рая половина (C-концевая часть) транспозазы содержит DDE/D-домен, который обладает эндонуклеазной и лигирующей активностью, необходимой для вырезания и вставки транспозона. Название (DDE/D) домена основано на присутствии триады консервативных маркерных аминокислотных остатков – два аспартата (D) и третий либо глутамат (E), либо аспарат. Между первым и вторым маркерными аспартатами находятся, как правило, от 90 до 110 а.о. Расстояние между вторым и третьим маркерными остатками (составляет обычно от 30 до 40 а.о.) является консервативным и часто используется как классификационный признак транспозонов *ITm* (например, семейство *Visitor* – DD40-41D, семейство *mariner* – DD34D, семейство *Tc1* – DD34E) [32–34]. Также транспозазы *ITm* могут содержать сигнал ядерной локализации (NLS), который, как предполагается, способствует транспорту транспозазы из цитоплазмы в ядро [59, 60].

Изучение структуры полноразмерных транспозаз у элементов *L31* двустворчатых показало, что ДНК-связывающий домен, GRPR-подобный мотив и каталитический домен присутствуют практически во всех последовательностях (рис. 4). В отдельных случаях некоторые структуры не обнаружены. Так, в элементе *L31-1a\_MPhi* не найдена третья  $\alpha$ -спираль, а в *L31-1a\_MGal* – шестая  $\alpha$ -спираль. В целом вторая триада  $\alpha$ -спиралей ДНК-связывающего домена имеет большую вариативность, чем первая триада  $\alpha$ -спиралей. GRPR-подобный мотив в четырех последовательностях был неизвестен (*L31-1a\_MPhi*, *L31-1c\_Cari*, *L31-5\_AIrr*, *L31-4a\_MMer*) (рис. 4). NLS-мотив найден в четырех *L31*-транспозонах (*L31-2a\_MEdu*, *L31-2a\_MCal*, *L31-4a\_MPhi*, *L31-4a\_CSin*) (рис. 4). Каталитический домен сохранился во всех полноразмерных транспозазах и имел паттерн DD37E. Только элемент *L31-5\_AIrr* содержал DD38E домен (рис. 4).

Для сравнения каталитических доменов элементов *L31* разных кластеров мы выбрали три области, включающие каждый из маркерных аминокислотных остатков триады DDE протяженностью 10 а.о., и создали обобщенные последовательности (рис. 5). Сходства и различия в обобщенных последовательностях между всеми кластерами *L31*-транспозонов подтвердили адекватность подразделения на группы. Кластер *L31-5* включал только два элемента в связи с чем обобщенную последовательность области глутамата (третий маркерный остаток) получить не удалось. Однако области первых двух маркерных остатков были более консервативными и также имели отличия от других кластеров (рис. 5).

L31-2a\_MEdU ----MATKKNYGREYLAGKATGRMRSILVQEMIEA~~GANLKTGEVPRGVYTKIADKFKINRQSVTNFWKRYVSEGTISQKXKXKTKMLGRK~~-LNEP DVRLIEFTKKNPSITARELKDITLLRYSE  
L31-2b\_MEdU ----MERQNKYGRFRKQGFKLSDDFFRTLLTDKCLEYGGNSDNQITPRGTFSKVSSEELVTDFFVRRMQRQFIDK-EVKCRPKH---GLQPKLSM~~PDRYIILAKMKKPTTISLSELRKLLHNSV~~  
L31-1a\_1\_MGai1 ----MKRNNQGRQKISAGKALGDDLRGLIVHELKESG~~HVGNH-SIPKGIAPKVAEYKIKITKQVHNHKKWYNE~~DL-EVSRRCAG---GRPRKYGI~~DEIEFVNVLKTERPSPQNTLRDQLLQYSA~~  
L31-2b\_MGai1 ----MERQNKYGRFRKQGFKLSDDFFRTLLTDKCLEYGGNSDNQITPRGTFSKVSSEELVTDFFVRRMQRQFIDK-EVKCRPKH---GLQPKLSM~~PDRYIILAKMKKPTTISLSELRKLLHNSV~~  
L31-1a\_MPhi ----MEKKSISGRSYNGKALGDGLRSLITDGLDAGAKI~~G-KMPKGLVGRVAEYKVCQOTITVYRLWKKYS~~EDL-SIKRRPYST---GRPKKYV~~EELEFVHVLKKEPSSMLQTKVQDQLLQYS~~  
L31-2a\_MPhi ----MESEDCSKTNDFRQFQKGRALSLEFQRLIVQEI~~KKESGG-SLLEVPFQIYSKVRGKFKIHTSSVTKIWRRLFENG-CPSEPRPHGK~~-QNVGKLT~~PPDPQFIEVLRKREKPSICIKDIRKELYEHS~~  
L31-4a\_MPhi ----MATRKNKSHGRCMPKAIQDQLRQLIVQNVLES~~GGNASTGEVPLGTITNASKLKISRQSVNIVRRFLSDA-SVAEKRR~~TSN---GNPKL~~TEPDRMIEFLKRETTISITARELKEKLTYS~~SV  
L31-1b\_CGig ----MEKEKRF---ISQKGVLSKDMRKILVTKLKEI~~GSDEESKFSPRGAFSIVRSNLNLDLRVGRVWSEFCERR-DFSTLKDKNKG~~  
L31-2a\_1\_CGig ----MCTKRNMYGREYQOQIELSDFRSLIQDLD~~DRGCDASAGKVPWGLSATAKKEFVSVKTVNKNWRFRVEH~~G-TCTEKMRNKS---GPRKLT~~EPDRFIECLKRETPSMSCKEIQELRRYSPV~~  
L31-1a\_CVir ----MAKINSAGRVYDKGTPLGIDLRSSINYMEE~~GAKGFSQLPRGLPQVSEIFKVSHPILVTKWQYQIEG--IVLKEPYK~~G---GRKRLD~~DEEDVQIHFLKRETPSMSLKSVEEVLQYS~~  
L31-1d\_SGlo ----MEKRNKYGRVFNKGLPSNDLRGLIVQDCEMGG~~----VPGKVKELAKKYKLNPDITRVMLKHIEGE-QISKPT~~---GRPKLT~~DEEDVFI~~SALKTRPMSOLETIRDOVIQNS  
L31-1a\_Chon ----MCTKRNMYGREYQOQIEGLTDFRSLIQDLD~~DRGCDASAGKVPWGLSATAKKEFVSVKTVNKNWRFRVEH~~G-TCTEKMRNKS---GPRKLT~~EPDRFIECLKRETPSMSCKEIQELRRYSPV~~  
L31-1c\_Cari ----MLSVNRRNIAGRVYKGIPTGIDYRRSIDYME~~SNGARLGEYSLPRGLKRTASQKEKVCPATITTFWQYCNEG--CVKVPVQ~~TNR---GRKKLT~~EEEDVVRFLKHVRPMSPLQTVRDELLKNS~~  
L31-1a\_1\_CHon ----MLSVNRRNIAGRAYEKGIPTGIDYRRSIDY~~MESNGARLGEYSLPRGLKRTASQKEKVCPATITTFWQYCNEG--CVKVPVQ~~TNR---GRKKLT~~EEEDVVRFLKHVRPMSPLQTVRDELLKNS~~  
L31-1b\_2\_CHon ----MLSVNRRNIAGRAYEKGIPTGIDYRRSIDY~~MESNGARLGEYSLPRGLKRTASQKEKVCPATITTFWQYCNEG--CVKVPVQ~~TNR---GRKKLT~~EEEDVVRFLKHVRPMSPLQTVRDELLKNS~~  
L31-1a\_CGig ----MLSVNRRNIAGRAYEKGIPTGIDYRRSIDY~~MESNGARLGEYSLPRGLKRTASQKEKVCPATITTFWQYCNEG--CVKVPVQ~~TNR---GRKKLT~~EEEDVVRFLKHVRPMSPLQTVRDELLKNS~~  
L31-2a\_AlrR ----MATRKNKSHGRCMPKAIQDQLRQLIVQNVLES~~GGNASTGEVPLGTITNASKLKISRQSVNIVRRFLSDA-SVAEKRR~~TSN---GNPKL~~TEPDRMIEFLKRETTISITARELKEKLTYS~~SV  
L31-5\_AlrR ----MTRKNKSHGRCMPKAIQDQLRQLIVQNVLES~~GGNASTGEVPLGTITNASKLKISRQSVNIVRRFLSDA-SVAEKRR~~TSN---GNPKL~~TEPDRMIEFLKRETTISITARELKEKLTYS~~SV  
L31-2a\_PMax ----MNRNVDINVRGIVKGIPTGIDYRRSIDYME~~SNGARLGEYSLPRGLKRTASQKEKVCPATITTFWQYCNEG--CVKVPVQ~~TNR---GRKKLT~~EEEDVVRFLKHVRPMSPLQTVRDELLKNS~~  
L31-4b\_Plmb ----MKKSHVNNKGRYVKGKPLGEDLSLIVQVLE~~KEGANSERFPFGEKAKAGEFRNVSNTIKNIWTLYQDSG-DVKHRQAR~~---GRPKLT~~DEEDVFI~~AAIKKPKFFLENIKEKLLQNA  
L31-1a\_1\_Plmb ----MSKSKGRLVKFSGTSLASDFRLNISLKL~~DYDANDTGSIPRGIKAKVSKELLDNKCVTRAWLSWINDK-NVESPK~~---GPTKGS~~GGISLQDNDLHYEFLKRETPSMSLREIHNLK~~  
L31-4a\_2\_Plmb ----MSKSKGRLVKFSGTSLASDFRLNISLKL~~DYDANDTGSIPRGIKAKVSKELLDNKCVTRAWLSWINDK-NVESPK~~---GPTKGS~~GGISLQDNDLHYEFLKRETPSMSLREIHNLK~~  
L31-3a\_Plmb ----MATRKNKSHGRCMPKAIQDQLRQLIVQNVLES~~GGNASTGEVPLGTITNASKLKISRQSVNIVRRFLSDA-SVAEKRR~~TSN---GNPKL~~TEPDRMIEFLKRETTISITARELKEKLTYS~~SV  
L31-2a\_1\_MCa1 ----MATKKNYGREYLAGKATGRMRSILVQEMIEA~~GANLKTGEVPRGVYTKIADKFKINRQSVTNFWKRYVSEGTISQKXKXKTKMLGRK~~-LNEP DVRLIEFTKKNPSITARELKDITLLRYSE  
L31-4a\_MMer ----MATSCKPKG----GRPLSDFRLLIKMIN~~FGANDELNIKPRGVTIARQLEIDRGTVNRINWYKCTK-NCA~~PSYIR---HASKLTD~~DEHQYIIFLQVTPSLSGISLKDLSAMC~~  
L31-4a\_CSin ----MKRLEK-----KLSDEFLLVIRIKKLG~~GDDETNTVPRGTATVARSGVHTTVKNINWYKCTK-NCA~~PSYIR---HASKLTD~~DEHQYIIFLQVTPSLSGISLKDLSAMC~~

L31-2a\_MEdU A-SANV-DVSTIYRTMSRDL---DFTFKR---LHRPSGRDFTFR-NMRYTQAYLDFQCQTKRPHQIKFDESGFKLVTA-NRNYGHSKK-GEQCIEIGRFEGANLTLNCLIGLDCVLYNFVFDGSPNS  
L31-2b\_MEdU VPPNNV-SRMTICRVKIKDL---NMTFKK---VSRPKAERTFAA-NLRYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_1\_MGai1 ----ISSI-STSTVSRIITKDL---NMTYKRTCITHYKKNRMRV-NLQYQOFLYVNDKFLPKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2b\_MGai1 VPPNNV-SRMTICRVKIKDL---NMTFKK---VSRPKAERTFAA-NLRYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_MPhi ----IEAI-SYASISRMINDL---NMTYKR---VTHYKKEFTLG-NLQYQOFLYVNDKFLPKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2b\_MPhi I-DGGV-SLSTIGRAVNNLEGGKWTLLK---LERPLGRFSIP-NLRYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2a\_MPhi ----TGNV-HEITTYRAINIKDL---NMTFKR---LIRPIGRFSAYIYMYRQAFIDYQCTKQPHQIKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-4a\_MPhi ----TTNV-EVQKQRAVKGKPLGGEVTKYK---LTFPSKDRFTDG-NIEYTESFELMLHADPYKLFKFDDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1b\_CGig T-LQNI-SLPTVSNIRKDL---HMTLKR---VTFCHGNRFTLP-NLQYQOFLYVNDKFLPKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2a\_1\_CGig ----SGEV-SLPTINRCILIKDL---KFTYKR---LKYSERIERTND-NMYSQAYIDFQCQTKRQIKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_CVir A-VIKV-SESTISRHKLNDL---NMTYKR---IARYSKNRFTPO-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1d\_SGlo ----VQNV-SLSTVCRALIKDL---SMTYKR---ITKYDKDRFTLN-NLIFQOFLYVNDKFLPKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_Chon ----SGEV-SLPTINRCILIKDL---KFTYKR---LKYSERIERTND-NMYSQAYIDFQCQTKRQIKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1c\_Cari S-MEYV-GLSTISRTKEDL---NMTYKR---ISKINKNRFTPO-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_1\_CHon ----ITSI-ISSTISNTIKEDL---NMTYKR---ISKINKNRFTPO-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1a\_2\_CHon S-IEITL-GLSTISRTKEDL---NMTYKR---ISKINKNRFTPO-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-1b\_CGig T-LQNI-SLPTVSNIRKDL---HMTLKR---VTFCHGNRFTLP-NLQYQOFLYVNDKFLPKFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2a\_AlrR ----SGNV-HNSFIYRAMSKL---DLTYKR---INRPSCDRFTQY-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-5\_AlrR ----NKEV-ITWTLSNTRIKEDLIGQQTTRKV---LTKATERTFPA-NBQYTEAVIEQSKPLRQVCFKVFDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-4b\_Plmb ENCNKI-IHESIHALKQNLAGEFTTRK---LCKPARERTSD-NLKYTEALMYSQKDVHRIKYPDEAGFNSRDC-SPYIGHALR-GERAVEVSSKAKSNTLNLMLGVNVHNCIVDGAATD  
L31-4a\_1\_Plmb ENCNKI-IHESIHALKQNLAGEFTTRK---LCKPARERTSD-NLKYTEALMYSQKDVHRIKYPDEAGFNSRDC-SPYIGHALR-GERAVEVSSKAKSNTLNLMLGVNVHNCIVDGAATD  
L31-3a\_Plmb ----TGMV-GEQLIGKAVKQLPAGETTRKI---ITQRNRRYTDG-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGYVVVTA-HRTGRHSEV-GTRCEVERVYHNPNVTLNLVLGMRVYHNFVDSGTS  
L31-2a\_1\_MCa1 ----NANV-DVSTIYRTMSRDL---DFTFKR---LHRPSGRDFTFR-NMRYTQAYLDFQCQTKRPHQIKFDESGFKLVTA-NRNYGHSKK-GEQCIEIGRFEGANLTLNCLIGLDCVLYNFVFDGSPNS  
L31-4a\_MMer ----NVDI-SKPAICGFLK---EMTKRI---LTKPAERFND-NMNYTQAFIDHITQDLANKLIFWDESGFKLVTA-NRNYGHSKK-GEQCIEIGRFEGANLTLNCLIGLDCVLYNFVFDGSPNS  
L31-4a\_CSin ----DLEV-SLSTVSRIITKDL---YNTKRL---LTPAADRFTDI-NRQYQAFIDALHQDQVSAIKFDESGFKLVTA-NRNYGHSKK-GEQCIEIGRFEGANLTLNCLIGLDCVLYNFVFDGSPNS

L31-2a\_MEdU ERYLNFWEASLSQDCYGRPTFLPGDGLIIVDNCAI~~HHNQS-ERILNFTFMMQGDYGLFVPSYDPLN~~IECFSKIKTVIKQERFKELVSKNKLAV---IKAIQEINQS~~DIHGFRYRHTGYFN~~  
L31-2b\_MEdU NTYLQFMGEASHTENGISVSPGDTIIVDNSPL~~HNRA-EVTLANFPAPMGVYTLFMPVYSPDLN~~SAEPVFMKSVILKQERFQIILKENLKVAV---SLSGEVTSDTREFNGTGMFN  
L31-1a\_1\_MGai1 GEYLQFMGEASHTENGISVSPGDTIIVDNSPL~~HNRA-EVTLANFPAPMGVYTLFMPVYSPDLN~~SAEPVFMKSVILKQERFQIILKENLKVAV---IKAIQEINQS~~DIHGFRYRHTGYFN~~  
L31-2b\_MGai1 NTYLQFMGEASHTENGISVSPGDTIIVDNSPL~~HNRA-EVTLANFPAPMGVYTLFMPVYSPDLN~~SAEPVFMKSVILKQERFQIILKENLKVAV---IKAIQEINQS~~DIHGFRYRHTGYFN~~  
L31-1a\_MPhi VEFLQFMGEASHTENGISVSPGDTIIVDNSPL~~HNRA-EVTLANFPAPMGVYTLFMPVYSPDLN~~SAEPVFMKSVILKQERFQIILKENLKVAV---IKAIQEINQS~~DIHGFRYRHTGYFN~~  
L31-2b\_MPhi AFYVNFHEAIESVTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNDSEV-EVLSNYSFMQNGYVFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-2a\_MPhi ATYVNFHEAIESVTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNDSEV-EVLSNYSFMQNGYVFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-4a\_MPhi FDFMDFITECVHSVQFEGELALQDGLIVDNS~~PLHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1b\_CGig IEFLHFLGEGAVNATEDEGERVLRQDGLIVDN~~APTHNS-EVLRNWLFTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-2a\_1\_CGig TYTLNFWEAIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1a\_CVir TEYVQFIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1a\_Chon TYTLNFWEAIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1a\_Cari TEYVQFIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1c\_Cari TEYVQFIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1a\_1\_CHon TEYVQFIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1a\_2\_CHon TEYVQFIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-1b\_CGig IEFLHFLGEGAVNATEDEGERVLRQDGLIVDN~~APTHNS-EVLRNWLFTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-2a\_AlrR NTYLNFWEAIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-2a\_PMax NTYLNFWEAIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-5\_AlrR MEMLSFEEALRQNDLGNRVFAMGDVVVDCN~~CFGRAGERILRMLDNGAVELVQVPSFYQNI~~BCVPHAMRCLRDN---TSFTNFTELA---VTALGDITP~~RELANFLRQYV~~  
L31-4b\_Plmb DEFLKFI~~DEAATSFSDGSPVFDGGLVVDKATIR~~HEA-ERILRIFNNGVYIEFLKQYSPDMPNVECFKAKIKSLMTQERFRELASVNLKLSI---IRAIETIT~~PTDMQGFYRHTGCVN~~  
L31-4a\_1\_Plmb IQYLNFDQAI~~DSYDEGHALVFDGIVVDNA~~PVHRYSG-GNALSVDLQDQIEVTEPTYSPOPNPVECFKAKIKSLMTQERFRELASVNLKLSI---IRAIETIT~~PTDMQGFYRHTGCVN~~  
L31-2a\_Plmb DNFVNFHEAIESVTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-3a\_Plmb DNFVNFHEAIESVTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-2a\_1\_MCa1 ERYLNFWEAIAEQSDTEDEGVPLSPGDIVVDNA~~APHNS-ERLNRNFLTIGVYIFLPTYSPOPNP~~VELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-4a\_MMer DTMEFVFNALNSITNYGDLALRQDGLIIVDN~~CPHRA-EDVLSRMLDRFGEYI~~LLPTYSPOPNPVELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV  
L31-4a\_CSin DTVYVNFQAINATNAGDFALRQDGLIIVDN~~CPHRA-EEILRNFVLRHGEYI~~FAPTYSPHNPVELCFSKIKQTL-QNRYNVLKNDLKVAV---YKAFGEISLADTCSFFQATEYIDV

Рис. 4. Множественное выравнивание последовательностей транспозаз L31-транспозонов.  $\alpha$ -Спирали ДНК-связывающего домена выделены серым. Предполагаемый NLS обозначен полужирным курсивом. Триада DDE каталитического домена выделена черным. GPRK-мотив обозначен полужирным и подчеркнут.

Группа элементов	Область первого маркерного аминокислотного основания DDE-домена	Область второго маркерного аминокислотного основания DDE-домена	Область третьего маркерного аминокислотного основания DDE-домена
<i>L31-1</i>	LKFMDEMGTK	IVDNAPATHHN	SPDLNPAEQC
<i>L31-2</i>	LKFMDESSEK	IVDNCAATHHN	SPDLNPNVENC
<i>L31-3</i>	LKFFDESSEK	IVDNCPTTHKN	SPDLNPAENC
<i>L31-4</i>	LKFEDEAGFA	VVDNAPATHRE	SPDLNPNVELC
<i>L31-5</i>	MLFFDEASTT	VEDNAGGFFHQ	RDELNECENF

Рис. 5. Особенности консервативных районов каталитического домена транспозазы элементов *L31*. Маркерные аминокислотные остатки каталитического домена выделены серым.

#### Предполагаемая функция белка, кодируемого второй OPC *L31*-транспозонов

Поскольку в ходе исследования выяснилось, что белок, кодируемый OPC2, является постоянным и достаточно консервативным компонентом *L31*-транспозонов, мы решили подробнее изучить его предполагаемые функции. В качестве референсной использовали последовательность белка, кодируемого OPC2 элемента *L31-1b\_CGig* (*C. gigas*), протяженностью 368 а.о.

Несмотря на то что ранее в аминокислотной последовательности, кодируемой OPC2 элемента *Mariner-31 CGi*, был выявлен домен Myosin\_tail\_1 (pfam01576) [35], поиск гомологий с известными консервативными доменами в коллекциях NCBI с помощью BLAST в этот раз не дал результатов. Анализ с помощью сервисов поиска доменов CDD и Dompred также не выявил никаких гомологий.

Анализ с помощью FFPred 3, предназначенным для предсказания функции (в терминах генной онтологии) аминокислотных последовательностей, когда гомология с известными белками малоинформативна, позволил выявить несколько возможных вариантов. Среди функций, связанных с биологическими процессами, наибольшие значения достоверности имели транспорт (GO:0006810), регуляция транскрипции на основе нуклеиновых кислот (GO:1903506) и регуляция биосинтеза РНК (GO:2001141). Среди предсказанных молекулярных функций наиболее достоверными были: связывание с белками цитоскелета (GO:0008092), связывание с нуклеиновыми кислотами (GO:0003676) и связывание с актином (GO:0003779). Наиболее вероятными структурами из компонентов клеток, с которыми связана предполагаемая функция белка, кодируемого OPC2, были мито-

хондрии (GO:0005739), митохондриальная мембрана (GO:0031966) и мембрана (GO:0016020).

Исследование с помощью MEMSAT, который позволяет на основе аминокислотных последовательностей предсказать топологию, показало, что кодируемый OPC2 белок может быть трансмембранным. При этом N-конец белка (1–37 а.о.) – это предположительно его внеклеточная часть, 38–53 а.о. – трансмембранная, а с 54 а.о. до конца – внутриклеточная. Эти данные отчасти согласуются с предсказанием связи с мембранами, полученными в результате анализа с использованием FFPred 3.  $\alpha$ -Спиральные трансмембранные белки участвуют в клеточной передаче сигналов, транспорте мембрано-непроницаемых молекул, межклеточной связи, распознавании клеток и клеточной адгезии [52].

Анализ белка, кодируемого OPC2 элемента *L31-1b\_CGig*, с помощью сервиса предсказания третичной структуры на основе поиска гомологий с известными белками SWISS-MODEL выявил сходство с четырьмя белками: белком комплекса ядерной поры (нуклеопорин) NUP58 (5ijn.1.G), субъединицей E фактора транскрипции II (TFIIIE) (5oqm.1.U), белком с цинковыми пальцами NBR1 (2bkf.1.A) и тектином-2 (7rro.32.A). При этом центральная часть белка, кодируемого OPC2, гомологична NUP58, TFIIIE и тектину-2, тогда как N-конец сходен только с NBR1.

Нуклеопорин NUP58 входит в состав комплекса ядерной поры, который обеспечивает транспорт молекул через ядерную мембрану в обоих направлениях [61]. Субъединица E фактора транскрипции II участвует в плавлении ДНК в области промотора во время транскрипции [62]. Тектин-2 является компонентом центриолей [63], а цинковые пальцы являются

модулями, взаимодействующими с ДНК, РНК, другими белками или небольшими молекулами [64]. Обобщая функциональные аспекты, с которыми связаны четыре приведенных белка, можно выделить трансмембранный транспорт, участие в синтезе РНК, взаимодействие с ДНК, РНК и белками, что коррелирует с данными, полученными с использованием FFPred 3.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования *L31*-транспозонов двустворчатых моллюсков получена детальная информация о разнообразии, распространении и структуре этих элементов. Эти данные позволяют классифицировать *L31*-транспозоны как самостоятельное надсемейство, входящее в большую группу (инфракласс) *ITm*. Внутри надсемейства нами выделено пять кластеров, что свидетельствует о его эволюционном разнообразии. Из всех моллюсков *L31*-транспозоны выявлены только у двустворчатых [35]. Однако и внутри этого класса наблюдается ограниченное распространение элементов *L31*. На данный момент показано присутствие *L31*-транспозонов в подклассе *Autobranchia* с преобладанием по разнообразию и количеству в инфраклассе *Pteriomorpha* (рис. 3). Ограниченное распространение дает основание предполагать, что предковый *L31*-транспозон двустворчатых появился после дивергенции этой группы организмов. Класс двустворчатые отделился от брюхоногих приблизительно 530 млн лет назад [65]. Предковый *L31*-транспозон мог возникнуть у моллюсков как в ходе эволюции элементов *ITm*, так и проникнуть в прародителя таксона в результате горизонтального переноса. Явление горизонтального переноса играет значимую роль в широком распространении и эволюции ДНК-транспозонов [66, 67]. Функциональные, транспозиционно-активные элементы эукариот способны колонизировать геномы новых хозяев и мультиплицироваться, внося вклад в эволюцию и биоразнообразие. Описано довольно много случаев горизонтального переноса элементов инфракласса *ITm* [67].

Наиболее вероятно, что эволюционное и структурное разнообразие *L31*-транспозонов двустворчатых является следствием эволюции представителей этого надсемейства ДНК-транспозонов уже внутри таксона. Это связано с этапом диверсификации, который в ходе “жизненного цикла” транспозонов следует, как правило, после колонизации генома хозяина. “Жизненный цикл” включает этапы колонизации, диверсификации, деградации, элиминации [11]. Альтернативными итогами окончания “жизненного цикла” ДНК-транспозонов могут быть молекулярная доместикация, горизонтальный

перенос в новый геном и рестарт “жизненного цикла” внутри прежнего генома [11, 35, 48, 68]. Распространение представителей различных кластеров *L31*-транспозонов среди отрядов двустворчатых указывает на то, что событие диверсификации также произошло достаточно давно, так как в одном отряде могут встречаться элементы разных кластеров (табл. 3).

Малое количество копий отражает, по-видимому, невысокую транспозиционную активность *L31*-транспозонов. В сочетании с высоким разнообразием это может свидетельствовать о возможных событиях так называемого рестарта “жизненного цикла” внутри прежнего генома, когда в результате мутационных процессов появляется активный транспозон с функциональной транспозазой. Относительно высокое число копий с потенциально функциональной транспозазой у элемента *L31-4a\_PImb* (*Pinctada imbricata*) может свидетельствовать о том, что он по-прежнему активен или был активным сравнительно недавно (по эволюционным меркам).

Вариации в длине элементов и размерах КИП (СИП), на наш взгляд, также отражают долгий эволюционный путь представителей надсемейства *L31*. Однако несмотря на древность происхождения, у многих элементов сохранилась вторая ОРС, что дает основание предполагать необходимость продукта этого гена для транспозиционной активности *L31*-транспозонов. Близкими эволюционными группами надсемейства *L31* являются *TBE* и *Tec* [30], что подтверждается и в данной работе (рис. 2). Примечательно, что и *TBE*, и *Tec* по структуре тоже отличаются от основного массива элементов инфракласса *ITm*. Элементы семейства *TBE* имеют небольшие КИП (около 80 п.н.) и несут три ОРС, кодирующих транспозазу, небольшую ОРС с неизвестной функцией и белок с цинковыми пальцами [69, 70]. Элементы *Tec* имеют очень длинные КИП (около 700 п.н.) и три ОРС: транспозазы, белка с неизвестной функцией и сайт-специфической рекомбиназы, которая может выполнять транспозицию в отсутствие специальной транспозазы [71, 72]. Представители обеих групп пока выявлены только у инфузорий [69, 71]. Белок ОРС2 *L31*-транспозонов, как и дополнительные белки элементов *TBE* и *Tec*, сохраняется в ходе эволюции (и отбора), поэтому, соответственно, его функция может быть связана с обеспечением транспозиционной активности. Поскольку часто белки обладают мультифункциональностью, то и белок ОРС2 может участвовать как в регуляции транскрипции транспозазы, так и в обеспечении транспорта транспозазы через ядерный поровый комплекс, или даже транспорта *L31*-транспозона через клеточную мембрану.

Полученные данные о структуре, разнообразии и распространении элементов *L31* двусторчатых моллюсков способствуют лучшему пониманию эволюции представителей инфракласса *ITm*. Дальнейшее изучение *L31*-транспозонов в других таксонах (стрекающие), а также исследование функции белка второй ОРС позволит лучше понять эволюцию ДНК-транспозонов, механизмы горизонтального переноса и вклад в биоразнообразии эукариот.

Аминокислотные последовательности транспозаз представлены в Дополнительных материалах. (см на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Puzakov\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Puzakov_rus.pdf))

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (номер гос. регистрации 121041400077-1).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arkhipova I.R., Yushenova I.A. (2019) Giant transposons in eukaryotes: is bigger better? *Genome Biol. Evol.* **11**, 906–918. doi: 10.1093/gbe/evz041
2. Bourque G., Burns K.H., Gehring M., Gorbunova V., Seluanov A., Hammell M., Imbeault M., Izsvák Z., Levin H.L., Macfarlan T.S., Mager D.L., Feschotte C. (2018) Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol.* **19**, 199. doi: 10.1186/s13059-018-1577-z
3. Kidwell M.G., Lisch D.R. (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 95–99. doi: 10.1016/s0169-5347(99)01817-0
4. Sotero-Caio C.G., Platt R.N., Suh A., Ray D.A. (2017) Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. *Genome Biol. Evol.* **9**, 161–177. doi: 10.1093/gbe/evw264
5. Gao B., Shen D., Xue S. Chen C., Cui H., Song C. (2016) The contribution of transposable elements to size variations between four teleost genomes. *Mob. DNA.* **7**, 4. doi: 10.1186/s13100-016-0059-7
6. Petrov D.A. (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* **17**, 23–28. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02157-0
7. Юрченко Н.Н., Коваленко Л.В., Захаров И.К. (2011) Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов. *Вавил. журн. генетики и селекции.* **15**, 261–270.
8. Grabundzija I., Messing S.A., Thomas J. Cosby R.L., Bilic I., Miskey C., Gogol-Döring A., Kapitonov V., Diem T., Dalda A., Jurka J., Pritham E.J., Dyda F., Izsvák Z., Ivics Z. (2016) A *Helitron* transposon re-constructed from bats reveals a novel mechanism of genome shuffling in eukaryotes. *Nat. Commun.* **7**, 10716. doi: 10.1038/ncomms10716
9. Craig N.L., Chandler M., Gellert M., Lambowitz A., Rice P.A., Sandmeyer S. (2015) *Mobile DNA III*. Washington, USA: ASM Press.
10. Sultana T., Zamborlini A., Cristofari G., Lesage P. (2017) Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 292–308. doi: 10.1038/nrg.2017.7
11. Blumenstiel J.P. (2019) Birth, school, work, death, and resurrection: the life stages and dynamics of transposable element proliferation. *Genes (Basel).* **10**, 336. doi: 10.3390/genes10050336
12. Bowen N.J., Jordan I.K. (2007) Exaptation of protein coding sequences from transposable elements. *Genome Dyn.* **3**, 147–162.
13. Venner S., Feschotte C., Biémont C. (2009) Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. *Trends Genet.* **25**, 317–323.
14. Boissinot S., Chevret P., Furano A.V. (2000) *L1 (LINE-1)* retrotransposon evolution and amplification in recent human history. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 915–928. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026372
15. Platt R.N. 2nd, Vandeweghe M.W., Ray D.A. (2018) Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution. *Chromosome Res.* **26**, 25–43. doi: 10.1007/s10577-017-9570-z
16. Sinzelle L., Izsvák Z., Ivics Z. (2009) Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1073–1093. doi: 10.1007/s00018-009-8376-3
17. Chow K.C., Tung W.L. (2000) Magnetic field exposure stimulates transposition through the induction of *DnaK/J* synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 745–748. doi: 10.1006/bbrc.2000.2496
18. Бубенщикова Е.В., Антоненко О.В., Васильева Л.А., Ратнер В.А. (2002) Индукция транспозиций *МГЭ 412* отдельно тепловым и холодным шоком в сперматогенезе у самцов дрозофилы. *Генетика.* **38**, 46–55.
19. Del Re B., Garoia F., Mesirca P. Agostini C., Bersani F., Giorgi G. (2003) Extremely low frequency magnetic fields affect transposition activity in *Escherichia coli*. *Radiat. Environ. Biophys.* **42**, 113–118. doi: 10.1007/s00411-003-0192-9
20. Захаренко Л.П., Коваленко Л.В., Перепелкина М.П., Захаров И.К. (2006) Влияние  $\gamma$ -радиации на индукцию транспозиций *hobo*-элемента у *Drosophila melanogaster*. *Генетика.* **42**, 763–767.
21. Васильева Л.А., Выхристюк О.В., Антоненко О.В., Захаров И.К. (2007) Индукция транспозиций мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* различными

- стрессовыми факторами. *Информацион. Вестн. ВОГУС*. **11**, 662–671.
22. Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. (2008) Мобильные элементы и стресс. *Информацион. Вестн. ВОГУС*. **12**, 217–242.
  23. Piacentini L., Fanti L., Specchia V., Bozzetti M.P., Berloco M., Palumbo G., Pimpinelli S. (2014) Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability. *Chromosoma*. **123**, 345–354. doi: 10.1007/s00412-014-0464-y
  24. Auvinet J., Graça P., Belkadi L., Petit L., Bonnivard E., Dettai A., Detrich W.H. 3rd, Ozouf-Costaz C., Higuët D. (2018) Mobilization of retrotransposons as a cause of chromosomal diversification and rapid speciation: the case for the Antarctic teleost genus *Trematomus*. *BMC Genomics*. **19**, 339. doi: 10.1186/s12864-018-4714-x
  25. Kojima K.K. (2020) Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. *Genes Genet. Syst.* **94**, 233–252. doi: 10.1266/ggs.18-00024
  26. Kapitonov V.V., Jurka J. (2008) A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 411–412. doi: 10.1038/nrg2165-c1
  27. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 973–982. doi: 10.1038/nrg2165
  28. Yuan Y.W., Wessler S.R. (2011) The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 7884–7889. doi: 10.1073/pnas.110420810829
  29. Shi S., Puzakov M., Guan Z., Xiang K., Diaby M., Wang Y., Wang S., Song C., Gao B. (2021) Prokaryotic and eukaryotic horizontal transfer of *Sailor* (dd82e), a new superfamily of *IS630-Tc1-Mariner* DNA-transposons. *Biology (Basel)*. **10**, 1005. doi: 10.3390/biology10101005
  30. Dupeyron M., Baril T., Bass C., Hayward A. (2020) Phylogenetic analysis of the *Tc1/mariner* superfamily reveals the unexplored diversity of *pogo*-like elements. *Mob. DNA*. **11**, 21. doi: 10.1186/s13100-020-00212-0
  31. Shao H.G., Tu Z.J. (2001) Expanding the diversity of the *IS630-Tc1-mariner* superfamily: discovery of a unique DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons. *Genetics*. **159**, 1103–1115. doi: 10.1093/genetics/159.3.1103
  32. Tellier M., Bouuaert C.C., Chalmers R. (2015) *Mariner* and the *ITm* superfamily of transposons. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0033-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0033-2014
  33. Gao B., Wang Y.L., Diaby M., Zong W., Shen D., Wang S., Chen C., Wang X., Song C. (2020) Evolution of *pogo*, a separate superfamily of *IS630-Tc1-mariner* transposons, revealing recurrent domestication events in vertebrates. *Mob. DNA*. **11**, 25.
  34. Coy M.R., Tu Z.J. (2010) *Gambol* and *Tc1* are two distinct families of DD34E transposons: analysis of the *Anopheles gambiae* genome expands the diversity of the *IS630-Tc1-mariner* superfamily. *Insect Mol. Biol.* **14**, 537–546. doi: 10.1111/j.1365-2583.2005.00584.x
  35. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. (2018) An analysis of *IS630/Tc1/mariner* transposons in the genome of a pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Mol. Evol.* **86**, 566–580. doi: 10.1007/s00239-018-9868-2
  36. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
  37. Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. (2016) Application of the MAFFT sequence alignment program to large data – reexamination of the usefulness of chained guide trees. *Bioinformatics*. **32**, 3246–3251. doi: 10.1093/bioinformatics/btw4122016
  38. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu30039
  39. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522. doi: 10.1093/molbev/msx281
  40. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermini L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. **14**, 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285
  41. Zhang H.H., Li G.Y., Xiong X.M., Han M.J., Zhang X.G., Dai F.Y. (2016) *TRT*, a vertebrate and protozoan *Tc1*-like transposon: current activity and horizontal transfer. *Genome Biol. Evol.* **8**, 2994–3005. doi: 10.1093/gbe/evw213
  42. Sang Y., Gao B., Diaby M., Zong W., Chen C., Shen D., Wang S., Wang Y., Ivics Z., Song C. (2019) *Incomer*, a DD36E family of *Tc1/mariner* transposons newly discovered in animals. *Mob. DNA*. **10**, 45. doi: 10.1186/s13100-019-0188-x
  43. Zong W., Gao B., Diaby M., Shen D., Wang S., Wang Y., Sang Y., Chen C., Wang X., Song C. (2020) *Traveler*, a new DD35E family of *Tc1/mariner* transposons, invaded vertebrates very recently. *Genome Biol. Evol.* **12**, 66–76. doi: 10.1093/gbe/evaa034
  44. Gao B., Zong W., Miskey C., Ullah N., Diaby M., Chen C., Wang X., Ivics Z., Song C. (2020) *Intruder* (DD38E), a recently evolved sibling family of *DD34E/Tc1* transposons in animals. *Mob. DNA*. **11**, 32. doi: 10.1186/s13100-020-00227-7
  45. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. (2020) The *Tc1*-like elements with the spliceosomal introns in mollusk genomes. *Mol. Genet. Genomics*. **295**, 621–633. doi: 10.1007/s00438-020-01645-1
  46. Shen D., Gao B., Miskey C., Chen C., Sang Y., Zong W., Wang S., Wang Y., Wang X., Ivics Z., Song C. (2020) Multiple Invasions of *Visitor*, a DD41D family of *Tc1/mariner* transposons, throughout the evolution

- of vertebrates. *Genome Biol. Evol.* **12**, 1060–1073. doi: 10.1093/gbe/evaa135
47. Пузаков М.В., Пузакова Л.В. (2022) Распространенность, разнообразие и эволюция ДНК-транспозонов *L18* (DD37E) в геномах стрекающих (Cnidaria). *Молекуляр. биология.* **56**, 476–490. doi: 10.31857/S0026898422030120
  48. Wang S., Diaby M., Puzakov M., Ullah N., Wang Y., Danley P., Chen C., Wang X., Gao B., Song C. (2021) Divergent evolution profiles of DD37D and DD39D families of *Tc1/mariner* transposons in eukaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **161**, 107143. doi: 10.1016/j.ympev.2021.10714349
  49. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V., Sang Y. (2021) The *IS630/Tc1/mariner* transposons in three ctenophore genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **163**, 107231. doi: 10.1016/j.ympev.2021.107231
  50. Buchan D.W.A., Jones D.T. (2019) The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucl. Acids Res.* **47**, 402–407. doi: 10.1093/nar/gkz297
  51. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004
  52. Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C.J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R.A., Zhang D., Zheng C., Geer L.Y., Bryant S.H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucl. Acids Res.* **45**, D200–D203. doi: 10.1093/nar/gkx1129
  53. Boratyn G.M., Schäffer A.A., Agarwala R., Altschul S.F., Lipman D.J., Madden T.L. (2012) Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct.* **7**, 12. doi: 10.1186/1745-6150-7-12
  54. Bryson K., Cozzetto D., Jones D.T. (2007) Computer-assisted protein domain boundary prediction using the DomPred server. *Curr. Protein Pept. Sci.* **8**, 181–188. doi: 10.2174/138920307780363415
  55. Cozzetto D., Minneci F., Carrant H., Jones D.T. (2016) FFPred 3: feature-based function prediction for all Gene Ontology domains. *Sci. Rep.* **6**, 31865. doi: 10.1038/srep31865
  56. Nugent T., Jones D.T. (2009) Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics.* **10**, 159. doi: 10.1186/1471-2105-10-159
  57. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Wong G., Chinikar S., Hajivand Z., Mokhayeri H., Nowotny N., Kayedi M.H. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucl. Acids Res.* **46**, W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427
  58. Ivics Z., Izsvák Z. (2015) *Sleeping Beauty* transposition. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0042-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014
  59. Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell.* **91**, 501–510. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80436-560
  60. Plasterk R.H., Izsvák Z., Ivics Z. (1999) Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* **15**, 326–332. doi: 10.1016/s0168-9525(99)01777-1
  61. Arai Y., Hosoda F., Kobayashi H., Arai K., Hayashi Y., Kamada N., Kaneko Y., Ohki M. (1997) The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of *de novo* and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, *NUP98*, with the putative RNA helicase gene, *DDX10*. *Blood.* **89**, 3936–3944.
  62. Lee T.I., Young R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 77–137. doi: 10.1146/annurev.genet.34.1.77
  63. Nigg E.A., Raff J.W. (2009) Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell.* **139**, 663–678. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.036
  64. Klug A. (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 213–231. doi: 10.1146/annurev-biochem-010909-095056
  65. Kumar M., Suleski J.E., Craig A.E., Kaspruwicz A.E., Sanderford M., Li M., Stecher G., Hedges S.B. (2022) TimeTree 5: an expanded resource for species divergence times. *Mol. Biol. Evol.* **39**, msac174. doi: 10.1093/molbev/msac174
  66. Cummings M.P. (1994) Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 141–145. doi: 10.1016/0169-5347(94)90179-1
  67. Wallau G.L., Ortiz M.F., Loreto E.L. (2012) Horizontal transposon transfer in eukarya: detection, bias, and perspectives. *Genome Biol. Evol.* **4**, 689–699. doi: 10.1093/gbe/evs055
  68. Jangam D., Feschotte C., Betrán E. (2017) Transposable element domestication as an adaptation to evolutionary conflicts. *Trends Genet.* **33**, 817–831. doi: 10.1016/j.tig.2017.07.011
  69. Hunter D.J., Williams K., Cartinhour S., Herrick G. (1989) Precise excision of telomere-bearing transposons during *Oxytricha fallax* macronuclear development. *Genes Dev.* **3**, 2101–2112. doi: 10.1101/gad.3.12b.210170
  70. Chen X., Landweber L.F. (2016) Phylogenomic analysis reveals genome-wide purifying selection on *TBE* transposons in the ciliate *Oxytricha*. *Mob. DNA.* **7**, 2. doi: 10.1186/s13100-016-0057-9
  71. Jahn C.L., Doktor S.Z., Frels J.S., Jaraczewski J.W., Krikau M.F. (1993) Structures of the *Euplotes crassus* *Tec1* and *Tec2* elements: identification of putative transposase coding regions. *Gene.* **133**, 71–78. doi: 10.1016/0378-1119(93)90226-s
  72. Doak T.G., Witherspoon D.J., Jahn C.L., Herrick G. (2003) Selection on the genes of *Euplotes crassus* *Tec1* and *Tec2* transposons: evolutionary appearance of a programmed frameshift in a *Tec2* gene encoding a tyrosine family site-specific recombinase. *Eukaryot. Cell.* **2**, 95–102. doi: 10.1128/EC.2.1.95-102.2003



## Structure and Evolution of DNA Transposons of the *L31* Superfamily of Bivalves

M. V. Puzakov<sup>1</sup>\*, and L. V. Puzakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

\* e-mail: puzakov@ngs.ru

DNA transposons of the *IS630/Tc1/mariner* (*ITm*) are widespread representatives of DNA transposons that make a significant contribution to the evolution of eukaryotic genomes. With the start of large-scale application of next generation sequencing (NGS) technologies and the emergence of many new whole genome sequences of organisms in nucleotide collections, *ITm* elements have been identified in most taxa of the eukaryotic tree of life. Despite the rather detailed study of the diversity of *ITm* representatives, elements are still found that contribute to the expansion and revision of the classification of this group of DNA transposons. This paper presents for the first time a detailed analysis of the *L31* elements of bivalves, which resulted in a description of the structure, diversity, distribution, and phylogenetic position among the *ITm* elements. It was found that *L31* transposons are an independent superfamily in the *ITm* group, which has an ancient origin. Within the *L31* clade, rather high diversity was observed: five phylogenetic clusters were identified. At the moment, the presence of *L31* transposons in molluscs has been revealed only in bivalves in the subclass Autobranchia, with a predominance in diversity and quantity in the infraclass Pteriomorpha. It has also been shown that the protein encoded by the second open reading frame (ORF2) is an integral structural component of almost all full-length *L31* elements. The data obtained contribute to a better understanding of the evolution of representatives of *ITm* transposons. Further study of *L31* transposons in other taxa (cnidaria), as well as the study of the function of the second ORF protein, will provide an opportunity to better understand the evolution of DNA transposons, the mechanisms of horizontal transfer, and the contribution to eukaryotic biodiversity.

**Keywords:** DNA transposons, *L31* transposons, bivalves, genome evolution, biodiversity

## КЛАДСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕЛКОВЫХ ПОВТОРОВ У ПТИЦ<sup>#</sup>

© 2024 г. S. Sharma<sup>a</sup>, L. Teekas<sup>a</sup>, N. Vijay<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup> Computational Evolutionary Genomics Laboratory, Department of Biological Sciences, IISER Bhopal, Bhauri, Madhya Pradesh, 462066 India

\*e-mail: nagarjun@iiserb.ac.in

Поступила в редакцию 20.03.2023 г.

После доработки 25.04.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Белковые повторы – источник быстрой эволюционной и функциональной новизны. Повторы имеют решающее значение в процессах развития, нейрогенеза, иммунитета и патологий. Варибельность длины и чистота повторов могут повлиять на результат любого биологического процесса – из-за изменения структуры белка и аффинности белок-белковых взаимодействий. Такие резкие изменения способствуют быстрой адаптации видов к новой среде обитания или приобретению различных морфологических/физиологических особенностей. Класс птиц, насчитывающий более 11 000 видов, относится к наиболее распространенным среди позвоночных – птицы обитают повсеместно. Взрывная адаптивная радиация и функциональная диверсификация способствовали освоению птицами различных мест обитания. Благодаря большому разнообразию морфологии, физиологии, характера полета, поведения, окраски и цикла развития, птиц можно считать идеальной моделью для изучения роли белковых повторов в эволюционной новизне. Полученные нами результаты свидетельствуют о сходном разнообразии и доле повторов во всех рассмотренных отрядах птиц, что предполагает существенную роль повторов в целесообразных вариантах развития. Обнаружены сайты позитивного отбора в повторе PolyQ RUNX2 в кладе птиц и значительно сокращенные длины повторов у Psittacopasserae. У Galloanseriformes выявлен видовой сдвиг в сторону сокращения длины повторов. Интересно, что длина polyS-повтора в белке PCDH20 резко отличается у Galliformes и Anseriformes. Мы предполагаем, что варибельность длины серинового повтора и его взаимодействие с  $\beta$ -катенином в сигнальном пути Wnt/ $\beta$ -катенин могли способствовать адаптации птиц к соответствующим условиям окружающей среды. По результатам проведенного исследования можно сделать вывод о роли белковых повторов в функциональном/морфологическом разнообразии птиц. Кроме того, приведен обширный список генов со значительными различиями в длине повторов – для дальнейшего изучения роли варибельности длины в эволюционной новизне и быстрой функциональной диверсификации.

**Ключевые слова:** белковые повторы, вариация длины повтора, птицы, разнообразие, естественный отбор

DOI: 10.31857/S0026898424010066, EDN: OFVPXS

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcotte E.M., Pellegrini M., Yeates T.O., Eisenberg D. (1999) A census of protein repeats. *J. Mol. Biol.* **293**, 151–160.
2. Andrade M.A., Perez-Iratxeta C., Ponting C.P. (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134**, 117–131.
3. Albà M.M., Tompa P., Veitia R.A. (2007) Amino acid repeats and the structure and evolution of proteins. In: *Gene and Protein Evolution*. vol. 3. Basel: Karger, pp. 119–130.
4. Persi E., Wolf Y.I., Koonin E.V. (2016) Positive and strongly relaxed purifying selection drive the evolution of repeats in proteins. *Nat. Commun.* **7**, 13570.
5. Karlin S., Brocchieri L., Bergman A., Mrázek J., Gentles A.J. (2002) Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 333–338.
6. Toll-Riera M., Radó-Trilla N., Martys F., Albà M.M. (2012) Role of low-complexity sequences in the formation of novel protein coding sequences. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 883–886.

<sup>#</sup> Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

7. Schmitz-Linneweber C., Small I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* **13**, 663–670.
8. Renault L., Nassar N., Vetter I., Becker J., Klebe C., Roth M., Wittinghofer A. (1998) The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature.* **392**(6671), 97–101.
9. Jacobsen S.E., Binkowski K.A., Olszewski N.E. (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 9292–9296.
10. Varela M., Diaz-Rosales P., Pereiro P., Forn-Cuní G., Costa M.M., Dios S., Romero A., Figueras A., Novoa B. (2014) Interferon-induced genes of the expanded IFIT family show conserved antiviral activities in non-mammalian species. *PLoS One.* **9**, e100015.
11. Cerveny L., Straskova A., Dankova V., Hartlova A., Ceckova M., Staud F., Stulik J. (2013) Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. *Infect. Immun.* **81**, 629–635.
12. Lynch V.J., Wagner G.P. (2008) Resurrecting the role of transcription factor change in developmental evolution. *Evolution.* **62**, 2131–2154.
13. Emili A., Greenblatt J., Ingles C.J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1582–1593.
14. Pelassa I., Corà D., Cesano F., Monje F.J., Montarolo P.G., Fiumara F. (2014) Association of polyalanine and polyglutamine coiled coils mediates expansion disease-related protein aggregation and dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3402–3420.
15. Gemayel R., Chavali S., Pougach K., Legendre M., Zhu B., Boeynaems S., van der Zande E., Gevaert K., Rousseau F., Schymkowitz J., Babu M.M., Verstrepen K.J. (2015) Variable glutamine-rich repeats modulate transcription factor activity. *Mol. Cell.* **59**, 615–627.
16. Fiumara F., Fioriti L., Kandel E.R., Hendrickson W.A. (2010) Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins. *Cell.* **143**, 1121–1135.
17. Thirunavukkarasu K., Mahajan M., McLarren K.W., Stifani S., Karsenty G. 1998. Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor Osf2/Cbfa1 contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with Cbfb. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4197–4208.
18. Brown L.Y., Brown S.A. (2004) Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet.* **20**, 51–58.
19. Malik I., Kelley C.P., Wang E.T., Todd P.K. (2021) Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 589–607.
20. Mularoni L., Guigó R., Albà M.M. (2006) Mutation patterns of amino acid tandem repeats in the human proteome. *Genome Biol.* **7**(4), R33.
21. Wren J.D., Forgacs E., Fondon J.W. 3rd, Pertsemliadis A., Cheng S.Y., Gallardo T., Williams R.S., Shohet R.V., Minna J.D., Garner H.R. (2000) Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 345–356.
22. Newton A.H., Pask A.J. (2020) Evolution and expansion of the RUNX2 QA repeat corresponds with the emergence of vertebrate complexity. *Commun. Biol.* **3**, 771.
23. King D.G., Soller M., Kashi Y. (1997) Evolutionary tuning knobs. *Endeavour.* **21**, 36–40.
24. Hancock J.M., Simon M. (2005) Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution. *Gene.* **345**, 113–118.
25. Fondon J.W., Garner H.R. (2004) Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 18058–18063.
26. Mularoni L., Ledda A., Toll-Riera M., Albà M.M. (2010) Natural selection drives the accumulation of amino acid tandem repeats in human proteins. *Genome Res.* **20**, 745–754.
27. Kashi Y., King D.G. (2006) Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet.* **22**, 253–259.
28. Schüler A., Bornberg-Bauer E. (2016) Evolution of protein domain repeats in metazoa. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 3170–3182.
29. Teekas L., Sharma S., Vijay N. (2022) Lineage-specific protein repeat expansions and contractions reveal malleable regions of immune genes. *Genes Immun.* **23**(7), 218–234.
30. Mier P., Alanis-Lobato G., Andrade-Navarro M.A. (2017) Context characterization of amino acid homorepeats using evolution, position, and order. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **85**, 709–719.
31. Schweizer M., Liu Y. (2018) Avian diversity and distributions and their evolution through space and time. Springer, Cham, pp. 129–145.
32. de Oliveira T.D., Kretschmer R., Bertocchi N.A., Degrandi T.M., de Oliveira E.H.C., Cioffi M. de B., Garnero A.D.V., Gunski R.J. (2017) Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (Aves, Piciformes): implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. *PLoS One.* **12**, e0169987.
33. Zhang G., Li C., Li Q., Li B., Larkin D.M., Lee C., Storz J.F., Antunes A., Greenwold M.J., Meredith R.W., Ödeen A., Cui J., Zhou Q., Xu L., Pan H., Wang Z., Jin L., Zhang P., Hu H., Yang W., Hu J., Xiao J., Yang Z., Liu Y., Xie Q., Yu H., Lian J., Wen P., Zhang F., Li H., Zeng Y., Xiong Z., Liu S., Zhou L., Huang Z., An N., Wang J., Zheng Q., Xiong Y., Wang G., Wang B., Wang J., Fan Y., da Fonseca R.R., Alfaro-Núñez A., Schubert M., Orlando L., Mourier T., Howard J.T., Ganapathy G., Pfening A., Whitney O., Rivas M.V., Hara E., Smith J., Farré M., Narayan J., Slavov G., Romanov M.N., Borges R., Machado J.P., Khan I., Springer M.S., Gatesy J., Hoffmann F.G., Opazo J.C., Hästad O., Sawyer R.H., Kim H., Kim K.W., Kim H.J., Cho S., Li N., Huang Y., Bruford M.W., Zhan X., Dixon A., Bertelsen M.F., Derryberry E., Warren W., Wilson R.K., Li S., Ray D.A., Green R.E., O'Brien S.J., Griffin D., Johnson W.E., Haussler D., Ryder O.A.,

- Willerslev E., Graves G.R., Alström P., Fjeldså J., Mindell D.P., Edwards S.V., Braun E.L., Rahbek C., Burt D.W., Houde P., Zhang Y., Yang H., Wang J.; Avian Genome Consortium; Jarvis E.D., Gilbert M.T., Wang J. (2014) Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science*. **346**(6215), 1311–1320.
34. Andrews C.B., Mackenzie S.A., Gregory T.R. (2009) Genome size and wing parameters in passerine birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**, 55–61.
35. Schmid M., Nanda I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn M., Schartl M., Haaf T., Weigend S., Fries R., Buerstedde J.M., Wimmers K., Burt D.W., Smith J., A'Hara S., Law A., Griffin D.K., Bumstead N., Kaufman J., Thomson P.A., Burke T., Groenen M.A., Crooijmans R.P., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Tixier-Boichard M., Ladjali-Mohammedi K., Hillel J., Mäki-Tanila A., Cheng H.H., Delany M.E., Burnside J., Mizuno S. (2000) First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet. Cell Genet.* **90**, 169–218.
36. Brusatte S.L., O'Connor J.K., Jarvis E.D. (2015) The origin and diversification of birds. *Curr. Biol.* **25**, R888–898.
37. Moen D., Morlon H. (2014) From dinosaurs to modern bird diversity: extending the time scale of adaptive radiation. *PLoS Biol.* **12**, e1001854.
38. Howe K.L., Achuthan P., Allen J., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M.R., Armean I.M., Azov A.G., Bennett R., Bhai J., Billis K., Boddu S., Charkhchi M., Cummins C., Da Rin Fioretto L., Davidson C., Dodiya K., El Houdaigui B., Fatima R., Gall A., Garcia Giron C., Grego T., Guisjarro-Clarke C., Haggerty L., Hemrom A., Hourlier T., Izuogu O.G., Juettemann T., Kaikala V., Kay M., Lavidas I., Le T., Lemos D., Gonzalez Martinez J., Marugán J.C., Maurel T., McMahon A.C., Mohanan S., Moore B., Muffato M., Oheh D.N., Paraschas D., Parker A., Parton A., Prosovetskaia I., Sakthivel M.P., Salam A.I.A., Schmitt B.M., Schuilenburg H., Sheppard D., Steed E., Szpak M., Szuba M., Taylor K., Thormann A., Threadgold G., Walts B., Winterbottom A., Chakiachvili M., Chaubal A., De Silva N., Flint B., Frankish A., Hunt S.E., Iisley G.R., Langridge N., Loveland J.E., Martin F.J., Mudge J.M., Morales J., Perry E., Ruffier M., Tate J., Thybert D., Trevanion S.J., Cunningham F., Yates A.D., Zerbino D.R., Flicek P. (2021) Ensembl 2021 *Nucleic Acids Res.* **49**, D884–D891.
39. Sayers E.W., Beck J., Brister J.R., Bolton E.E., Canese K., Comeau D.C., Funk K., Ketter A., Kim S., Kimchi A., Kitts P.A., Kuznetsov A., Lathrop S., Lu Z., McGarvey K., Madden T.L., Murphy T.D., O'Leary N., Phan L., Schneider V.A., Thibaud-Nissen F., Trawick B.W., Pruitt K.D., Ostell J. (2020) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **48**(D1), D9–D16.
40. Jetz W., Thomas G.H., Joy J.B., Hartmann K., Mooers A.O. (2012) The global diversity of birds in space and time. *Nature*. **491**(7424), 444–448.
41. Harrison P.M. (2021) fLPS 2.0: rapid annotation of compositionally-biased regions in biological sequences. *PeerJ*. **9**, e12363.
42. Penn O., Privman E., Ashkenazy H., Landan G., Graur D., Pupko T. (2010) GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Res.* **38**, 23–28.
43. Edgar R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. **5**, 113.
44. Ge S.X., Jung D., Jung D., Yao R. (2020) ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. **36**, 2628–2629.
45. Conway J.R., Lex A., Gehlenborg N. (2017) UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics*. **33**, 2938–2940.
46. R Core Team. (2021) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://search.gesis.org/publication/zis-RCoreTeam2021R>
47. Felsenstein J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am. Soc. Nat.* **125**, 1–15.
48. Revell L.J. (2012) Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol. Evol.* **3**, 217–223.
49. Yang Z. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1586–1591.
50. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**, 583–589.
51. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303.
52. Goddard T.D., Huang C.C., Meng E.C., Pettersen E.F., Couch G.S., Morris J.H., Ferrin T.E. (2018) UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **27**, 14–25.
53. Selvatti A.P., Gonzaga L.P., Russo C.A.M. (2015) A Paleogene origin for crown passerines and the diversification of the Oscines in the New World. *Mol. Phylogenet. Evol.* **88**, 1–15.
54. Ericson P.G.P., Irestedt M., Johansson U.S. (2003) Evolution, biogeography, and patterns of diversification in passerine birds. *J. Avian Biol.* **34**, 3–15.
55. Vuckovic D., Dawson S., Scheffer D.I., Rantanen T., Morgan A., Di Stazio M., Vozzi D., Nutile T., Concas M.P., Biino G., Nolan L., Bahl A., Loukola A., Viljanen A., Davis A., Ciullo M., Corey D.P., Pirastu M., Gasparini P., Girotto G. (2015) Genome-wide association analysis on normal hearing function identifies PCDH20 and SLC28A3 as candidates for hearing function and loss. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5655–5664.
56. Lees A.C., Haskell L., Allinson T., Bezeng S.B., Burfield I.J., Renjifo L.M., Rosenberg K.V., Viswa-

- nathan A., Butchart S.H.M. (2022) State of the World's Birds. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **47**, 231–260.
57. Dyke G.J. (2001) The evolutionary radiation of modern birds: systematics and patterns of diversification. *Geol. J.* **36**, 305–315.
58. Tobias J.A., Ottenburghs J., Pigot A.L. (2020) Avian diversity: speciation, macroevolution, and ecological function. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **51**, 533–560.
59. Albà M.M., Guigó R. (2004) Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. *Genome Res.* **14**, 549–554.
60. Coletta A., Pinney J.W., Solís D.Y.W., Marsh J., Petti-fer S.R., Attwood T.K. (2010) Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. *BMC Syst. Biol.* **4**, 43.
61. Inohara N., Chamaillard M., McDonald C., Nuñez G. (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355–383.
62. Meylan E., Tschopp J., Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* **442**, 39–44.
63. Cohn M. (2002) The immune system: a weapon of mass destruction invented by evolution to even the odds during the war of the DNAs. *Immunol. Rev.* **185**, 24–38.
64. Kędzierski Ł., Montgomery J., Curtis J., Handman E. (2004) Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. **52**, 104–112.
65. Lavoie H., Debeane F., Trinh Q.D., Turcotte J.F., Corbeil-Girard L.P., Dicaire M.J., Saint-Denis A., Pagé M., Rouleau G.A., Brais B. (2003) Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2967–2979.
66. Cocquet J., De Baere E., Caburet S., Veitia R.A. (2003) Compositional biases and polyalanine runs in humans. *Genetics.* **165**, 1613–1617.
67. Caburet S., Demarez A., Moumné L., Fellous M., De Baere E., Veitia R.A. (2004) A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J. Med. Genet.* **41**, 932–936.
68. Lynch V.J., Wagner G.P. (2021) Cooption of polyalanine tract into a repressor domain in the mammalian transcription factor HoxA11. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*: 340(8), 486–495. doi: 10.1002/jez.b.23063
69. Eldon E., Kooyer S., D'Evelyn D., Duman M., Lawinger P., Botas J., Bellen H. (1994) The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development.* **120**, 885–899.
70. Kobe B., Deisenhofer J. (1995) Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 409–416.
71. Staahl B.T., Tang J., Wu W., Sun A., Gitler A.D., Yoo A.S., Crabtree G.R. (2013) Kinetic analysis of np-BAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways. *J. Neurosci.* **33**, 10348–10361.
72. Hargreaves D.C., Crabtree G.R. (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **21**, 396–420.
73. Chi T. (2004) A BAF-centred view of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 965–977.
74. Chi T.H., Wan M., Zhao K., Taniuchi I., Chen L., Uttman D.R., Crabtree G.R. (2002) Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature.* **418**, 195–199.
75. Pattenden S.G., Klose R., Karaskov E., Bremner R. (2002) Interferon- $\gamma$ -induced chromatin remodeling at the CIITA locus is BRG1 dependent. *EMBO J.* **21**, 1978–1986.
76. Eo S.H., Bininda-Emonds O.R.P., Carroll J.P. (2009) A phylogenetic supertree of the fowls (Galloanserae, Aves). *Zool. Scr.* **38**, 465–481.
77. Chen C.K., Chuang H.F., Wu S.M., Li W.H. (2019) Feather evolution from precocial to altricial birds. *Zool. Stud.* **58**, e24.
78. Meiri S., Murali G., Zimin A., Shak L., Itescu Y., Caetano G., Roll U. (2021) Different solutions lead to similar life history traits across the great divides of the amniote tree of life. *J. Biol. Res.* **28**, 3.
79. Rennert J., Coffman J.A., Mushegian A.R., Robertson A.J. (2003) The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol. Biol.* **3**, 1–11.
80. Mevel R., Draper J.E., Lie-a-Ling M., Kouskoff V., Lacaud G. (2019) RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development.* **146**(17), dev148296.
81. Galant R., Carroll S.B. (2002) Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature.* **415**, 910–913.
82. Gerber H., Seipel K., Georgiev O., Höfferer M., Hug M., Rusconi S., Schaffner W. (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science.* **263**, 808–811.
83. Redies C., Vanhalst K., van Roy F. (2005)  $\delta$ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2840–2852.
84. Ren D., Zhu X., Kong R., Zhao Z., Sheng J., Wang J., Xu X., Liu J., Cui K., Zhang X.H., Zhao H., Wong S.T.C. (2018) Targeting brain-adaptive cancer stem cells prohibits brain metastatic colonization of triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **78**, 2052–2064.
85. Yang X., Chen M.W., Terry S., Vacherot F., Chopin D.K., Bemis D.L., Kitajewski J., Benson M.C., Guo Y., Buttyan R. (2005) A human- and male-specific protocadherin that acts through the Wnt signaling pathway to induce neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 5263–5271.
86. Pancho A., Aerts T., Mitsogiannis M.D., Seuntjens E. (2020) Protocadherins at the crossroad of signaling pathways. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 117.
87. Rose A., Meier I. (2004) Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 209–217.
88. Wu Y., Zheng S., Yao J., Li M., Yang G., Zhang N., Zhang S., Zhong B. (2017) Decreased expression of protocadherin 20 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* **8**, 3018–3028.

89. Gong Z., Hu G. (2019) PCDH20 acts as a tumour-suppressor gene through the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*. **26**, 209–217.
90. Lv J., Zhu P., Yang Z., Li M., Zhang X., Cheng J., Chen X., Lu F. (2015) PCDH20 functions as a tumour-suppressor gene through antagonizing the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *J. Viral Hepat.* **22**, 201–211.
91. Carraro R.S., Nogueira G.A., Sidarta-Oliveira D., Gaspar R.S., Dragano N.R., Morari J., Bobbo V.C.D., Araujo E.P., Mendes N.F., Zanesco A.M., Tobar N., Ramos C.D., Toscaro J.M., Bajgelman M.C., Velloso L.A. (2021) Arcuate nucleus overexpression of NHLH2 reduces body mass and attenuates obesity-associated anxiety/depression-like behavior. *J. Neurosci.* **41**, 10004–10022.
92. Vella K.R., Good D.J. (2010) Nhlh2 is a cold-responsive gene. *Open Neuroendocrinol. J.* **3**, 38–44.
93. Good D.J., Porter F.D., Mahon K.A., Parlow A.F., Westphal H., Kirsch I.R. (1997) Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene. *Nat. Genet.* **15**, 397–401.
94. Johnson S.A., Marín-Bivens C.L., Miele M., Coyle C.A., Fissore R., Good D.J. (2004) The *Nhlh2* transcription factor is required for female sexual behavior and reproductive longevity. *Horm. Behav.* **46**, 420–427.
95. Tremblay L.O., Herscovics A. (2000) Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi  $\alpha$ 1,2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 31655–31660.
96. Gonzalez-Andrades M., Jalimarada S.S., Rodriguez-Benavente M., Feeley M.N., Woodward A.M., AbuSamra D.B., Argüeso P. (2020) Golgi  $\alpha$ 1,2-mannosidase I induces clustering and compartmentalization of CD147 during epithelial cell migration. *Cell Adh. Migr.* **14**, 96–105.
97. Li H., Wang G., Yu Y., Jian W., Zhang D., Wang Y., Wang T., Meng Y., Yuan C., Zhang C. (2018)  $\alpha$ -1,2-mannosidase MAN1C1 inhibits proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma. *J. Cancer.* **9**, 4618–4626.
98. Tu H.C., Hsiao Y.C., Yang W.Y., Tsai S.L., Lin H.K., Liao C.Y., Lu J.W., Chou Y.T., Wang H.D., Yuh C.H. (2017) Up-regulation of golgi  $\alpha$ -mannosidase IA and down-regulation of golgi  $\alpha$ -mannosidase IC activates unfolded protein response during hepatocarcinogenesis. *Hepatol. Commun.* **1**, 230–247.
99. Taniguchi N., Honke K., Fukuda M., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T. (2014) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Vol. 1–2. Eds Taniguchi N., Honke K., Fukuda M., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T. Tokyo: Springer Japan.
100. Mast S.W., Diekman K., Karavæg K., Davis A., Sifers R.N., Moremen K.W. (2005) Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology*. **15**, 421–436.

## Protein Repeats Show Clade-Specific Volatility in Aves

S. Sharma<sup>1</sup>, L. Teekas<sup>1</sup>, and N. Vijay<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> Computational Evolutionary Genomics Lab, Department of Biological Sciences, IISER Bhopal, Bhauri, Madhya Pradesh, 462066 India

\*e-mail: nagarjun@iiserb.ac.in

Protein repeats are a source of rapid evolutionary and functional novelty. Repeats are crucial in development, neurogenesis, immunity, and disease. Repeat length variability and purity can alter the outcome of a pathway by altering the protein structure and affecting the protein-protein interaction affinity. Such rampant alterations can facilitate species to rapidly adapt to new environments or acquire various morphological/physiological features. With more than 11,000 species, the avian clade is one of the most speciose vertebrate clades, with near-ubiquitous distribution globally. Explosive adaptive radiation and functional diversification facilitated the birds to occupy various habitats. High diversity in morphology, physiology, flight pattern, behavior, coloration, and life histories make birds ideal for studying protein repeats' role in evolutionary novelty. Our results demonstrate a similar repeat diversity and proportion of repeats across all the avian orders considered, implying an essential role of repeats in necessary pathways. We detected positively selected sites in the polyQ repeat of RUNX2 in the avian clade; and considerable repeat length contraction in the Psittacopasserae. The repeats show a species-wide bias towards a contraction in Galloanseriformes. Interestingly, we detected the length contrast of polyS repeat in PCDH20 between Galliformes and Anseriformes. We speculate that length variability of serine repeat and its interaction with  $\beta$ -catenin in the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway could have facilitated fowls to adapt to their respective environmental conditions. We believe our study emphasizes the role of protein repeats in functional/morphological diversification in birds. We also provide an extensive list of genes with considerable repeat length contrast to further explore the role of length volatility in evolutionary novelty and rapid functional diversification.

**Keywords:** protein repeats, repeat length variation, Aves, diversity, natural selection

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *Fos* И НЕКОТОРЫХ СВЯЗАННЫХ С НИМ ГЕНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НИСАГ (ISIAN) ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РЕСТРИКЦИОННОГО СТРЕССА

© 2024 г. Ю. В. Маковка<sup>a, b, \*</sup>, Л. А. Федосеева<sup>a</sup>, Д. Ю. Ощепков<sup>a</sup>,  
А. Л. Маркель<sup>a, b</sup>, О. Е. Редина<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090  
Россия

<sup>b</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

\*e-mail: makovkayv@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 30.06.2023 г.

Стрессовые воздействия могут играть значимую роль в развитии артериальной гипертензии и многих других осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Изучению молекулярных механизмов, вовлеченных в ответ организма на стрессовые воздействия, уделяется значительное внимание, но в понимании деталей этих механизмов все еще остается много белых пятен. Крысы линии НИСАГ моделируют стресс-чувствительную форму артериальной гипертензии. Они характеризуются генетически обусловленной повышенной активностью гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпато-адреномедуллярной систем, что предполагает функциональное состояние повышенной стресс-реактивности. Впервые в гипоталамусе взрослых самцов гипертензивных крыс НИСАГ исследована динамика экспрессии гена *Fos* и некоторых связанных с ним генов после однократного воздействия рестрикционного стресса разной продолжительности (30, 60 и 120 мин). Показана активация транскрипции гена *Fos* с пиком через 1 ч после начала такого воздействия. Динамика активации гена *Fos* совпадает с динамикой увеличения артериального давления. В процессе активации нейронов гипоталамуса изменяется уровень транскрипции и других генов, кодирующих транскрипционные факторы (*Jun*, *Nr4a3*, *Jdp2*, *Ppargc1a*), ассоциированные с развитием кардиоваскулярных заболеваний. Поскольку индукция *Fos* является маркером активации нейронов мозга, можно заключить, что повышенная стрессовая реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпатоадреналовой систем гипертензивных крыс НИСАГ при кратковременном рестрикционном стрессе сопровождается активацией нейронов гипоталамуса и повышением уровня артериального давления.

**Ключевые слова:** гены раннего ответа, гипоталамус, однократный рестрикционный стресс, крысы линии НИСАГ

**DOI:** 10.31857/S0026898424010079, **EDN:** OENGDY

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие гипертензивного статуса и его регуляция — это многокомпонентный процесс, на который влияют как генетические, так и средовые факторы. Крысы линии НИСАГ (ISIAN, inherited stress induced arterial hypertension) моделируют стресс-чувствительную форму артери-

альной гипертензии [1, 2]. Селекцию этих крыс проводили по признаку увеличения артериального давления (АД) при воздействии кратковременного рестрикционного стресса (ограничение подвижности в тесной проволочной клетке в течение 30 мин), который можно рассматривать как психоэмоциональный стресс [3].

У крыс НИСАГ гипертензия развивается спонтанно к 2-месячному возрасту, что обеспечивается генетически детерминированной повышенной реактивностью нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и симпато-адреномедуллярной систем [3]. У крыс НИСАГ в покое концентрации АКТГ

Сокращения. НИСАГ — линия крыс с наследуемой индуцированной стрессом артериальной гипертензией; WAG — линия крыс Wistar Albino Glaxo; АД — артериальное давление; ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени; АКТГ — адренкортикотропный гормон.

и кортикостерона в плазме крови не отличаются от значений у контрольных нормотензивных крыс, но в гипоталамусе увеличена концентрация норадреналина [4], а в надпочечниках повышена экспрессия гена тирозингидроксилазы, ключевого гена синтеза катехоламинов, и уровень адреналина [3], что предполагает снижение порога симпатической активации в ответ на стимуляцию. Сравнение транскриптомов ствола мозга, гипоталамуса, надпочечников и почек у гипертензивных крыс НИСАГ и нормотензивных контрольных крыс WAG в возрасте 3 мес. выявило многочисленные дифференциально экспрессирующиеся гены, многие из которых, согласно их функциональной аннотации, ассоциированы с ответом на стресс [5–9]. Эти данные позволяют говорить о том, что крысы НИСАГ находятся в состоянии хронического функционального напряжения нейроэндокринной системы, участвующей в регуляции АД.

У крыс НИСАГ рестрикционный стресс приводит к статистически значимому увеличению концентрации кортикостерона уже через 15 мин от начала стресса, а через 30 мин концентрация кортикостерона в плазме крови крыс НИСАГ становится значимо выше, чем у крыс контрольной линии [3], что можно рассматривать как важное звено в формировании повышенной реактивности в ответ на стрессовую стимуляцию.

Ранее нами было показано, что воздействия рестрикционного стресса в течение 2.5 ч достаточно для того, чтобы у крыс НИСАГ достоверно изменился уровень транскрипции ряда ключевых генов, характеризующих активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [3], а также ряда генов почек, ассоциированных с регуляцией водно-солевого баланса и уровня АД [10–12].

Известно, что концентрация глюкокортикоидов в плазме крови может быть важным фактором, регулирующим стресс-индуцированную экспрессию генов раннего ответа (*immediate-early genes*, IEG) как в структурах мозга, так и в периферических органах/тканях [13, 14]. Неоднократно было показано, что в ответ на острые стрессовые воздействия, в том числе на рестрикционный стресс, происходит активация генов раннего ответа, многие из которых кодируют факторы транскрипции [15, 16]. Индукция генов раннего ответа приводит к активации нейронов [17] и изменению синаптической пластичности [18]. Однако при хроническом воздействии стресса гены раннего ответа не активируются [19, 20]. Учитывая, что крысы НИСАГ характеризуются генетически предтерминированным состоянием хронического физиологического стресса, встает вопрос о том,

происходит ли у них активация генов раннего ответа в условиях кратковременного рестрикционного стресса, использованного при проведении селекции крыс данной линии.

Наиболее известными маркерами нейрональной активации являются гены *Fos* и *Jun* (протоонкогены *Fos* и *Jun*, субъединицы транскрипционного фактора AP-1 – activator protein 1). Активация *Fos* в гипоталамусе наблюдается при различных физических и психологических стрессовых воздействиях, при этом кинетика ответа *Fos* на разные раздражители может различаться [16]. Белок *Fos* вместе с членами семейства белков *Jun* образует функционально активный гетеродимерный фактор транскрипции, называемый AP-1 [21]. Репрессором AP-1 является белок, кодируемый геном *Jdp2* (*Jun dimerization protein 2*). Этот белок способен подавлять трансактивацию, осуществляемую белками семейства *Jun* [22, 23]. Активность AP-1 может модулироваться транскрипционным фактором NOR-1 (*Neuron-derived orphan receptor-1*), кодируемым геном раннего ответа *Nr4a3*, экспрессия которого индуцируется многочисленными стрессовыми факторами [24]. Предполагается, что важным партнером AP-1 в регуляции ответа на стрессовые воздействия может быть PGC-1alpha (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*), способный коактивировать огромное число различных транскрипционных факторов [25]. PGC-1alpha, кодируемый геном *Ppargc1a*, считается главным регулятором биогенеза митохондрий и клеточного стресса [26]. Экспрессия генов, зависящая от PGC-1alpha, также контролируется многими другими факторами, включая эстроген-связывающий рецептор альфа (*ERRalpha*) [25, 27].

Участие генов раннего ответа в реакции крыс НИСАГ на стресс не изучалось. Поскольку нейроны гипоталамуса играют ключевую роль в запуске нейроэндокринных и вегетативных адаптивных реакций на различные воздействия [28], в данной работе оценены возможные изменения в уровне транскрипции гена *Fos*, а также нескольких упомянутых выше, связанных с ним ключевых генов раннего ответа, кодирующих факторы транскрипции, в гипоталамусе крыс НИСАГ в условиях кратковременного рестрикционного стресса разной продолжительности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Животные.** Работа выполнена на самцах крыс гипертензивной линии НИСАГ/*Icgn* (крысы с Наследуемой Индуцируемой Стрессом Артериальной Гипертонией; *ISIAN/Icgn* – *Inherited Stress Induced Arterial Hypertension*) в возрасте 3 мес. Крыс содержали в стандартных условиях



конвенционального вивария Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Воду и сбалансированный корм крысы получали без ограничения. Крыс содержали в стандартных пластиковых клетках при режиме день/ночь – 12/12.

Воздействие рестрикционного стресса разной продолжительности на уровень транскрипции генов раннего ответа изучали на четырех группах самцов: 1) контрольная группа (без стресса); 2) стресс в течение 30 мин; 3) стресс в течение 1 ч; и 4) стресс в течение 2 ч. В каждой группе было по 7–8 крыс. В связи с тем, что активация молекулярных механизмов в ответ на стрессовые воздействия зависит от времени суток [14], все экспериментальные процедуры проводили в одно и то же время (в 2 ч дня по местному времени).

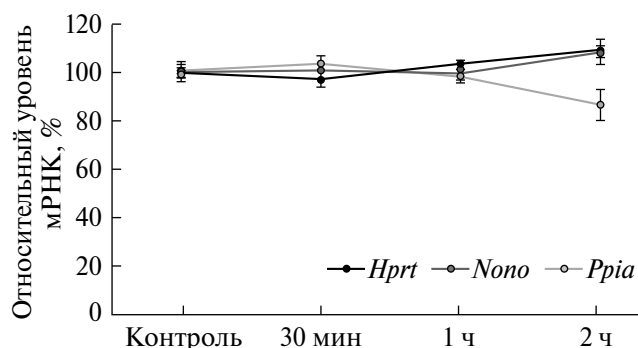
Базальный уровень АД в этом эксперименте не измеряли, чтобы избежать стресса, связанного с процедурой измерения. Измерение АД при стрессе проводили на ненаркотизированных крысах после помещения их на 30 мин, 1 либо 2 ч в тесную проволочную клетку-цилиндр (рестрикционный стресс). АД измеряли непрямым методом на хвосте (tail-cuff method), как описано в [3]. Для измерения АД за 30 мин до окончания стресса клетку с крысой помещали на теплую (37°C) платформу. Сразу после завершения стресса и измерения АД крыс быстро декапитировали и выделяли гипоталамус. Собранные образцы немедленно гомогенизировали в пробирках (1.5 мл) с использованием 700 мкл реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) и 500 мкл Lysing matrix D (Cat#6540434 “MP Biomedicals”, США) в течение 20 с при 18 000 об./мин в гомогенизаторе Super FastPrep-2 (“MP Biomedicals”).

Все процедуры проводили в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия), протокол № 115 от 20 декабря 2021 года.

**ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).** Суммарную РНК из гипоталамуса выделяли с использованием набора ExtractRNA (“Евроген”). Остаточную ДНК удаляли с помощью RQ1 RNase-Free DNase (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000C (“Thermo Scientific”, США). Обратную транскрипцию проводили в растворе объемом 50 мкл, содержащем 2 мкг РНК, 0.25 нмоль праймеров (N9 – случайные нонануклеотидные праймеры, “Биосан”, Россия), 36 мкл буфера для обратной транскрипции, 0.4 мМ dNTP (“Вектор-Бест”, Россия) и 100 ед.

акт. обратной транскриптазы MoMLV (“Биолаб-микс”, Россия). кДНК синтезировали в течение 1 ч при 37°C, затем 30 мин при 42°C и 10 мин при 50°C. Фермент инактивировали прогреванием смеси в течение 5 мин при 75°C. Из всех образцов отбирали по 5 мкл кДНК и смешивали. Этот усредненный раствор кДНК использовали в ПЦР-РВ в качестве “стандарта” для построения калибровочных кривых.

ПЦР-РВ проводили на приборе LightCycler 96 (“Roche Molecular Systems”, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл включала 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (“Syntol”, Россия), кДНК и праймеры (по 0.15 мкМ каждого). Олигонуклеотидные праймеры подбирали с помощью программы PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Гены и последовательности праймеров, использованных в работе, перечислены в табл. 1. В качестве генов сравнения использовали *Nono* (non-POU domain containing, octamer-binding), *Ppia* (peptidylprolyl isomerase A) и *Hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). Анализ содержания мРНК этих генов сравнения в гипоталамусе крыс НИСАГ не выявил статистически значимых изменений при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности (рис. 1).



**Рис. 1.** Динамика изменений содержания мРНК генов сравнения в гипоталамусе крыс НИСАГ при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности.

Использовали следующие условия ПЦР: начальная денатурация (5 мин, 95°C), 40 циклов амплификации (денатурация – 15 с, 95°C; отжиг – 20 с; элонгация – 20 с, 72°C; регистрация флуоресценции продукта – 10 с; температуры отжига и регистрации флуоресценции приведены в табл. 1). Специфичность продукта оценивали с помощью анализа кривой плавления.

Относительное содержание кДНК в экспериментальных образцах определяли методом стандартных кривых [29]. В качестве коэффи-

циента нормирования использовали среднее геометрическое значение данных по амплификации трех генов сравнения. Нормированный уровень мРНК в группе контрольных крыс принимали за 100%.

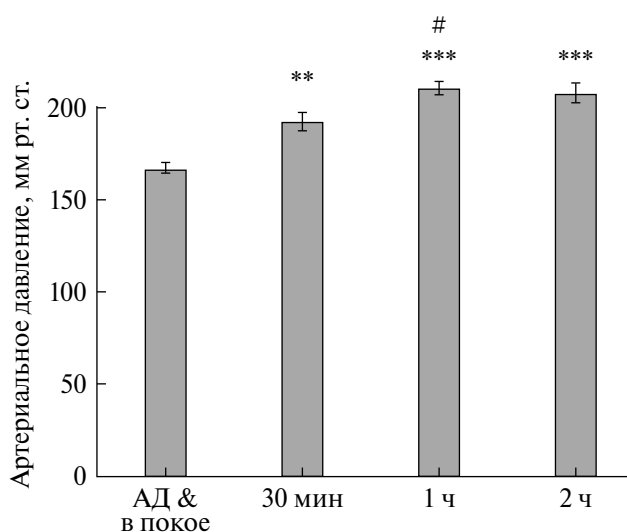
**Статистический анализ.** Результаты измерения АД анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента. Стресс-индуцированные изменения количества мРНК оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, Post-hoc, LSD test) с использованием пакета компьютерных программ Statistica 12.0 (“StatSoft”, США). Данные представлены в виде средних арифметических значений и ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ). Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень АД у крыс НИСАГ повышается в условиях рестрикционного стресса (рис. 2), достигая максимальных значений через 1 ч от начала стрессового воздействия и оставаясь на стабильно высоком уровне в течение второго часа.

Согласно данным, представленным во введении, для анализа были выбраны гены раннего ответа *Fos*, *Jun* и несколько связанных с ними генов, кодирующих транскрипционные факторы. Сравнение уровня транскрипции генов методом ПЦР-РВ показало, что воздействие рестрикционного стресса приводит к изменению уровня транскрипции почти всех взятых в анализ генов в гипоталамусе крыс НИСАГ (рис. 3). Однако максимальные изменения в уровне транскрипции разных генов наблюдаются при разной продолжительности стресса.

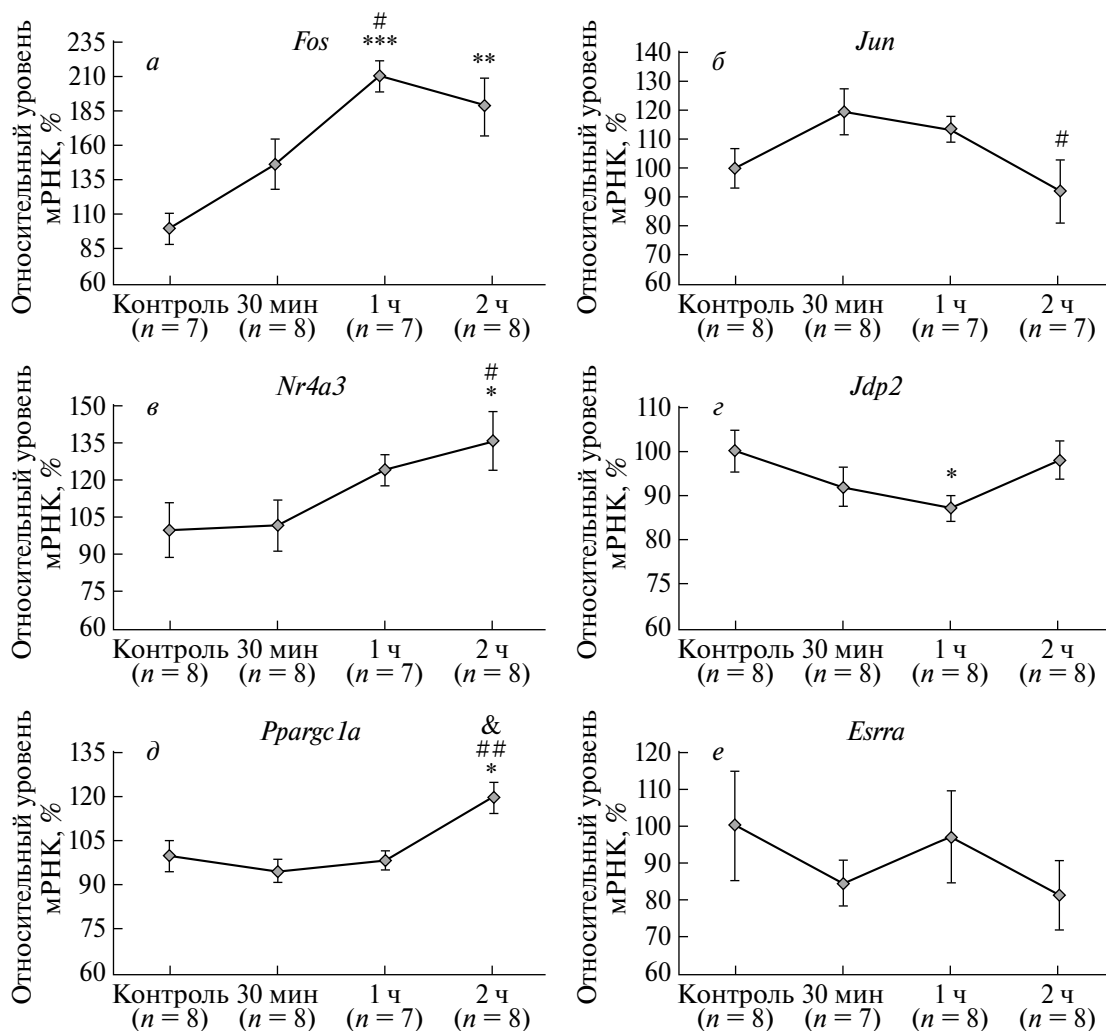
Наиболее значительными были изменения в количестве мРНК гена *Fos*, уровень транскрипции которого повысился более чем в 2 раза. Максимальная активация транскрипции гена *Fos* наблюдается через 1 ч после начала стресса. В течение следующего часа воздействия активация гена *Fos* оставалась достоверно более высокой, чем у контрольных животных (рис. 3а).



**Рис. 2.** Влияние рестрикционного стресса разной продолжительности на уровень артериального давления (АД) у самцов гипертензивных крыс НИСАГ. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с базальным уровнем АД; # $p < 0.05$  по сравнению с уровнем АД в группе крыс после 30 мин рестрикционного стресса (тест Стьюдента); & среднепопуляционный уровень базального АД (по данным [3]).

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для ПЦР с детекцией в режиме реального времени

Символ гена	Праймеры, 5'--->3'		Длина ПЦР-фрагмента, п.н.	Температура отжига, °C	Температура регистрации флуоресценции продукта, °C
	прямой	обратный			
<i>Ppia</i>	GTGTTCTTCGACATCACGGCT	CTGTCTTTGGAACCTTTGTCTGCA	82	60	83
<i>Hprt1</i>	CATTGTGGCCCTCTGTGTG	AACTTTTATGTCCCCCGTTGA	166	61	81
<i>Nono</i>	GCTAACACATTTCTCTCG	CTCATACTCAAAGGACCCA	157	61	81
<i>Jun</i>	CGCACGCTCCTAAACAAACT	TGAGGGCATCGTCGTAGAAG	176	64	84
<i>Fos</i>	CTCCTGAAGAGGAAGAGAAACG	TTCAAGTTGATCTGTCTCCGCT	122	58	82
<i>Jdp2</i>	AGGAGCTGAAATACGCTGAC	TCTTCTTCCTCATCTAGCTCAC	121	60	84
<i>Esrra</i>	TGCTCAGCTCTCTACCCAAA	CGCTTGGTGATCTCACACTC	169	63	86
<i>Nr4a3</i>	CGGTGCAGAAAAACGCAAAAT	ATCTGTACGCACAACCTTCTT	140	62	82
<i>Ppargc1a</i>	AATCAGACCTGACACAACGC	TGAAACCATAGCTGTCTCCATC	110	58	81



**Рис. 3.** Динамика стресс-индуцированных изменений содержания мРНК генов раннего ответа в гипоталамусе крыс НИСАГ при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности: *Fos* (а), *Jun* (б), *Nr4a3* (в), *Jdp2* (г), *Pparg1a* (д), *Esrra* (е). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  и \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  по сравнению с группой 30-минутного стресса; & $p < 0.05$  по сравнению с 1-часовым стрессом (Post-hoc, LSD test).

Экспрессия мРНК гена, кодирующего транскрипционный фактор *Jun*, после воздействия стресса не отличалась достоверно от значений в контроле ни в одной временной точке эксперимента. Максимальное повышение экспрессии гена *Jun* наблюдалось через 30 мин воздействия стресса, а через 2 ч от начала стресса уровень его транскрипции статистически значимо снижался, но при этом не отличался от контрольного уровня (рис. 3б). С использованием корреляционного анализа выявлена достоверная отрицательная корреляция между экспрессией генов *Jun* и *Jdp2* ( $r = -0.54$ ;  $p = 0.002$ ), что подтверждает их функциональную связь. Снижение уровня мРНК гена *Jdp2* отмечено после 1 ч рестрикции, после чего уровень его транскрипции начал восстанавливаться (рис. 3г).

Анализ уровня мРНК гена *Nr4a3* показал, что его транскрипция начинает активироваться через 1 ч и продолжает возрастать в течение следующего часа, достигая достоверных отличий от значений в контрольной группе животных, а также от животных, подвергавшихся стрессу в течение 30 мин (рис. 3в).

Анализ количества мРНК гена *Pparg1a* в гипоталамусе четырех групп животных показал, что экспрессия этого гена значимо повышается по сравнению с уровнем в контрольной группе через 2 ч после начала рестрикционного стресса (рис. 3д).

Не выявлено существенного влияния стресса на уровень транскрипции гена *Esrra* в гипоталамусе гипертонзивных крыс НИСАГ (рис. 3е).

Полученные результаты выявляют картину каскадной активации генов. Наиболее быстро активируются гены раннего ответа *Fos* и *Jun*. Учитывая значительную (более чем в 2 раза) активацию транскрипции *Fos*, можно предположить, что рестрикционный стресс в течение 1 ч может приводить к активации нейронов гипоталамуса. Поскольку динамика активации транскрипции гена *Fos* совпадает с динамикой повышения АД, можно выдвинуть предположение о существовании функциональных связей между этими процессами. Отрицательная корреляция между экспрессией генов *Jun* и *Jdp2* подтверждает их ожидаемую функциональную взаимосвязь и свидетельствует о значительной активации транскрипционного комплекса AP-1. Более поздняя активация генов *Nr4a3* и *Ppargc1a* хорошо согласуется с концепцией их каскадной активации, на которую, предположительно, могут влиять и другие гены раннего ответа, не проанализированные в данном исследовании. Возможно, ограничение эксперимента 2-часовым периодом стрессового воздействия не позволило выявить изменений в уровне транскрипции гена *Esrra*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведен анализ уровня транскрипции нескольких генов раннего ответа в гипоталамусе крыс гипертензивной линии НИСАГ, подвергнутых воздействию однократного краткосрочного рестрикционного стресса разной продолжительности (30 мин, 1 и 2 ч).

Проведенный ранее сравнительный анализ транскрипции генов в гипоталамусе крыс НИСАГ, моделирующих стресс-чувствительную форму артериальной гипертензии, и нормотензивных контрольных крыс WAG показал, что многие гены, имеющие межлинейные различия в уровне транскрипции, ассоциированы с ответом на стресс [5]. Соответственно, патофизиологическое состояние крыс НИСАГ можно рассматривать как состояние, характеризующееся хроническим напряжением ряда физиологических систем. Эти функциональные особенности обусловлены специфичностью гипертензивного генотипа крыс НИСАГ, который закрепился в результате селекции на резкое повышение уровня АД в условиях кратковременного (30 мин) рестрикционного стресса [1, 2]. Повышенный базальный уровень норадреналина в гипоталамусе [4] и адреналина в надпочечниках крыс НИСАГ [3] объясняет их повышенную стресс-реактивность и позволяет предположить, что состояние физиологического стресса гипертензивных крыс НИСАГ может быть ассоции-

ровано с хронической активацией симпатической нервной системы.

В ряде исследований, направленных на изучение активации генов раннего ответа, показано, что хронический (повторяющийся) рестрикционный стресс не вызывает активацию гена *Fos* в гипоталамусе крыс-самцов разных нормотензивных линий – Wistar [19] и Sprague-Dawley [20]. Согласно полученным нами результатам, состояние генетически обусловленного функционального стресса крыс НИСАГ не препятствует увеличению транскрипции гена *Fos* в гипоталамусе, а также ряда других ключевых генов раннего ответа при кратковременном однократном воздействии рестрикционного стресса. Активация экспрессии *Fos* считается признанным маркером активации нейронов [16]. Соответственно, можно предполагать, что кратковременный рестрикционный стресс приводит к активации нейронов гипоталамуса у гипертензивных крыс НИСАГ.

Пик транскрипционной активности гена *Fos* в гипоталамусе крыс НИСАГ наблюдается через 1 ч от начала стрессового воздействия и остается высоким по крайней мере в течение следующего часа (рис. 3а). Несколько отличающиеся результаты получены при изучении динамики активации гена *Fos* у других линий крыс.

У нормотензивных крыс Sprague-Dawley пик активации гена *Fos* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса наблюдался через 15 мин после начала рестрикционного стресса, а через 1 ч он восстанавливался до контрольного уровня [20]. Несколько иные результаты получены при изучении активации гена *Fos* в гипоталамусе гипертензивных крыс под действием кратковременного рестрикционного стресса. Пик кратковременного увеличения транскрипции гена *Fos* в гипоталамусе самцов крыс с пограничной гипертензией (F1-гибриды SHR×WKY) наблюдался через 30 мин иммобилизационного стресса и возвращался к контрольному уровню только через 3 ч [15]. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса самцов гипертензивных крыс SHRSP пик активности гена *Fos* выявлен через 30 мин после начала рестрикционного стресса [30]. При взрослении и усугублении патофизиологического состояния у гипертензивных крыс SHRSP, подвергнутых воздействию кратковременного (30 мин) стресса, наблюдается более сильная активация гена *Fos*, чем у нормотензивных контрольных животных [31]. Можно предположить, что динамика активации гена *Fos* может зависеть от патофизиологического состояния крыс, связанного с особенностями проявлений гипертензивного статуса. Изучение центральных механизмов активации нейронов при развитии соль-чувствительной гипертензии показало, что

активация центральной нервной системы крыс может зависеть от их генотипа [32]. Кинетика ответа *Fos* на острые стрессовые воздействия может быть как сходной, так и различаться при разных типах стресса [16, 33], а также в разных структурах мозга [20, 34, 35].

*Fos* является субъединицей транскрипционного комплекса AP-1, который непосредственно участвует в регуляции “поздних” генов, имеющих сайт связывания с AP-1 и контролирующих разнообразные функции клеток. AP-1 имеет большое значение для поддержания гомеостаза и регуляции стрессовых реакций посредством взаимодействия с сигнальными путями, регулируемые глюкокортикоидами [36]. Глюкокортикоиды могут влиять не только на активацию AP-1, они могут также контролировать активацию изученного нами гена *Nr4a3*. Недавно было показано, что гены *Fos* и *Nr4a3* относятся к генам, уровень транскрипции которых наиболее сильно изменяется (увеличивается) в паравентрикулярном ядре гипоталамуса через 1 ч после введения кортикостерона самцам крыс Wistar [37]. Поскольку рестрикционный стресс, использованный в нашем исследовании, значительно увеличивает концентрацию кортикостерона в плазме крови крыс НИСАГ [3], можно предположить участие этого механизма в активации транскрипции генов *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе этих крыс.

Показано, что повышение транскрипции гена *Fos* в ряде структур мозга может происходить и при активации симпатической нервной системы [38]. Известно, что различные виды стресса активируют норадренергические нейроны, и синтезированный норадреналин через восходящие (афферентные) пути поступает в различные области мозга, включая ядра гипоталамуса [38]. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса норадреналин может вызывать увеличение возбуждающих постсинаптических потенциалов. Показано, что этот процесс опосредован активацией  $\alpha 1$ -адренорецепторов [39, 40].

Связь активации генов раннего ответа с симпатической (адренергической) стимуляцией экспериментально подтверждена с использованием в качестве модели фибробластов *rat-1*, стабильно экспрессирующих  $\alpha 1a$ -адренергический рецептор. Анализ адренергического стресса разной продолжительности, вызванного в фибробластах *rat-1* добавлением фенилэфрина, выявил активацию многих генов раннего ответа, при этом особое внимание уделено кинетике экспрессии генов *Fos* и *Nr4a3*, которые относятся к пулу наиболее сильно активированных генов [41]. Пик транскрипции *Fos* наблюдали через 60 мин после стимуляции, а пик транскрипци-

онной активности *Nr4a3* — через 2 ч от начала стимуляции [41]. Видно, что кинетика транскрипции *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе крыс НИСАГ очень похожа на динамику активации *Fos* и *Nr4a3* при адренергическом стрессе, описанную на модели фибробластов *rat-1*. В связи с этим можно предполагать, что активация генов *Fos* и *Nr4a3* в гипоталамусе крыс НИСАГ, вызванная кратковременным рестрикционным стрессом, может быть ассоциирована с симпатической активацией.

Мы наблюдали одинаковую динамику активации гена *Fos* в гипоталамусе крыс НИСАГ и увеличения АД при воздействии рестрикционного стресса разной продолжительности, что указывает на существование функциональной связи между этими процессами. Аналогичные результаты получены ранее при изучении экспрессии *Fos* у крыс гипертензивной линии Lewis, у которых повышение АД сопровождалось увеличением *Fos*-подобной иммунореактивности в различных областях мозга, включая гипоталамус [42].

Комплекс AP-1 считается партнером PGC-1alpha в регуляции гипоксии, как показано на примере сложной транскрипционной сети пластичности мышечных клеток [25]. Как гипоксия [43], так и рестрикционный стресс [44, 45] вызывают состояние повышенного окислительного стресса в клетках. Активация *Fos* и последующая активация *Pprgc1a* при воздействии кратковременного рестрикционного стресса в нашем эксперименте указывает на возможность функциональной связи между AP-1 и PGC-1alpha в гипоталамусе крыс НИСАГ. Повышение экспрессии PGC-1alpha связано со снижением окислительного стресса и повреждения митохондрий [46] и считается механизмом защиты нейронов от вызванных стрессом повреждений [47], в частности, способствует снижению воспалительных процессов и апоптоза в гипоталамусе [48]. PGC-1alpha необходим для экспрессии генов, вовлеченных в процесс синхронного высвобождения нейротрансмиттеров [49], целостности аксонов в головном мозге [50], регуляции окислительно-метаболизма [51] и гипертензии [52].

Ранее было показано, что PGC-1alpha-зависимая экспрессия генов может зависеть от эстрогенсвязывающего рецептора альфа (ERRalpha) [27]. Однако в нашем исследовании не выявлено значимых изменений в уровне транскрипции гена *Esrra*. Это может быть связано с тем, что активация гена *Ppargc1a* в гипоталамусе крыс НИСАГ наблюдается только через 2 ч после начала стресса. Возможно, для активации гена *Esrra* требуется более продолжительное время.

Соответственно, обнаруженные нами изменения уровня транскрипции группы генов раннего ответа подтверждают, что, несмотря на признаки функционального хронического стресса, острый кратковременный рестрикционный стресс вызывает увеличение транскрипции гена *Fos*, указывая, возможно, на активацию нейронов гипоталамуса крыс НИСАГ. Этот процесс происходит при участии комплекса AP-1 и PGC-1 $\alpha$ , что свидетельствует об активации транскрипции с участием РНК-полимеразы II. Предполагается вовлеченность в эти процессы как глюкокортикоидной, так и адренергической стимуляции. Полученные результаты характеризуют крыс НИСАГ как модель, подходящую для изучения центральных механизмов активации нейронов при воздействии кратковременного рестрикционного (эмоционального) стресса. Выявление ключевых звеньев, ассоциированных с резким повышением уровня АД при воздействии рестрикционного стресса, будет способствовать определению потенциальных мишеней для коррекции и стабилизации уровня АД при стресс-чувствительной форме гипертонии у человека.

Авторы выражают благодарность конвенциональному виварию Центра генетических ресурсов лабораторных животных (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия) за разведение, регулярный уход и содержание экспериментальных крыс в рамках проекта Правительства России FWNR-2022-0008, а также Объединенному центру исследований генома ИЦиГ (бюджетный проект ИЦиГ № FWNR-2022-0017) за возможность использования приборов для определения качества и количества нуклеиновых кислот.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 22-14-00082).

Все процедуры проводили в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия), протокол № 115 от 20 декабря 2021 года.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markel A.L. (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genetic Hypertension*. **218**, 405–407.
2. Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S. (1999) Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats. *Dev. Hypertensive Phenotype: Basic and Clin. Studies*. **19**, 493–526.
3. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* **195**, 439–450.
4. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Polityko Y.K., Ershov N.I., Gilinsky M.A., Markel A.L. (2021). Hypothalamic norepinephrine concentration and heart mass in hypertensive ISIAH rats are associated with a genetic locus on chromosome 18. *J. Pers. Med.* **11**(2), 67.
5. Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Genome-wide transcriptome analysis of hypothalamus in rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BMC Genet.* **17**(Suppl 1), 13.
6. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Alexandrovich Y.V., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Molecular determinants of the adrenal gland functioning related to stress-sensitive hypertension in ISIAH rats. *BMC Genomics*. **17**(Suppl 14), 989.
7. Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Ershov N.I., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Comparative transcriptional profiling of renal cortex in rats with inherited stress-induced arterial hypertension and normotensive Wistar Albino Glaxo rats. *BMC Genet.* **17**(Suppl 1), 12.
8. Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) The gene-expression profile of renal medulla in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BMC Genet.* **17**(Suppl 3), 151.
9. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Orlov Y.L., Redina O.E. (2019) The differences in brain stem transcriptional profiling in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats. *BMC Genomics*. **20**, 297.
10. Пыльник Т.О., Плетнева Л.С., Редина О.Е., Смоленская С.Э., Маркель А.Л., Иванова Л.Н. (2011) Влияние эмоционального стресса на экспрессию мРНК гена  $\alpha$ -ENaC в почке гипертензивных крыс линии НИСАГ. *Докл. Акад. Наук.* **439**(4), 563–565.
11. Абрамова Т.О., Редина О.Е., Смоленская Ю.П., Маркель А. (2013) Усиленная экспрессия гена *EPHX2* в почках гипертензивных крыс НИСАГ. *Молекуляр. биология.* **47**(6), 942–948.
12. Абрамова Т.О., Смоленская С.Э., Антонов Е.В., Редина О.Е., Маркель А.Л. (2016) Экспрессия генов катехол-*o*-метилтрансферазы (COMT), минералокортикоидного рецептора (MLR) и эпителиального натриевого канала (ENaC) в почках гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) в покое и при ответе на стресс. *Генетика.* **52**(2), 180–187.
13. Senba E., Ueyama T. (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci. Res.* **29**, 183–207.

14. Girotti M., Weinberg M.S., Spencer R.L. (2007) Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology*. **148**, 2542–2552.
15. Mansi J.A., Rivest S., Drolet G. (1998) Effect of immobilization stress on transcriptional activity of inducible immediate-early genes, corticotropin-releasing factor, its type 1 receptor, and enkephalin in the hypothalamus of borderline hypertensive rats. *J. Neurochem.* **70**, 1556–1566.
16. Kovacs K.J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation – *c-fos* and beyond. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 665–672.
17. Guez-Barber D., Fanous S., Golden S.A., Schrama R., Koya E., Stern A.L., Bossert J.M., Harvey B.K., Picciotto M.R., Hope B.T. (2011) FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. *J. Neurosci.* **31**, 4251–4259.
18. Okuno H. (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci. Res.* **69**, 175–186.
19. Melia K.R., Ryabinin A.E., Schroeder R., Bloom F.E., Wilson M.C. (1994) Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J. Neurosci.* **14**, 5929–5938.
20. Girotti M., Pace T.W., Gaylord R.I., Rubin B.A., Herman J.P., Spencer R.L. (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced *c-fos* expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*. **138**, 1067–1081.
21. Foletta V.C., Segal D.H., Cohen D.R. (1998) Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 139–152.
22. Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge S.J., Karin M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094–3102.
23. Katz S., Heinrich R., Aronheim A. (2001) The AP-1 repressor, JDP2, is a bona fide substrate for the c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* **506**, 196–200.
24. Odagiu L., Boulet S., Maurice De Sousa D., Daudelin J.F., Nicolas S., Labrecque N. (2020) Early programming of CD8(+) T cell response by the orphan nuclear receptor NR4A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 24392–24402.
25. Baresic M., Salatino S., Kupr B., van Nimwegen E., Handschin C. (2014) Transcriptional network analysis in muscle reveals AP-1 as a partner of PGC-1 $\alpha$  in the regulation of the hypoxic gene program. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2996–3012.
26. Wenz T. (2013) Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 $\alpha$  under cellular stress. *Mitochondrion*. **13**, 134–142.
27. McMeekin L.J., Joyce K.L., Jenkins L.M., Bohannon B.M., Patel K.D., Bohannon A.S., Patel A., Fox S.N., Simmons M.S., Day J.J., Kralli A., Crossman D.K., Cowell R.M. (2021) Estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ ) is required for PGC-1 $\alpha$ -dependent gene expression in the mouse brain. *Neuroscience*. **479**, 70–90.
28. Hausl A.S., Brix L.M., Hartmann J., Pohlmann M.L., Lopez J.P., Menegaz D., Brivio E., Engelhardt C., Roeh S., Bajaj T., Rudolph L., Stoffel R., Hafner K., Goss H.M., Reul J., Deussing J.M., Eder M., Ressler K.J., Gassen N.C., Chen A., Schmidt M.V. (2021) The co-chaperone Fkbp5 shapes the acute stress response in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male mice. *Mol. Psychiatry*. **26**, 3060–3076.
29. Ginzinger D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* **30**, 503–512.
30. Imaki T., Shibasaki T., Chikada N., Harada S., Naruse M., Demura H. (1996) Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocr. J.* **43**, 629–638.
31. Imaki T., Naruse M., Harada S., Chikada N., Nakajima K., Yoshimoto T., Demura H. (1998) Stress-induced changes of gene expression in the paraventricular nucleus are enhanced in spontaneously hypertensive rats. *J. Neuroendocrinol.* **10**, 635–643.
32. Budzikowski A.S., Vahid-Ansari F., Leenen F.H. (1998) Chronic activation of brain areas by high-sodium diet in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.* **274**, H2046–2052.
33. Rivest S., Laflamme N. (1995) Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats. *J. Neuroendocrinol.* **7**, 501–525.
34. Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. **64**, 477–505.
35. Crane J.W., French K.R., Buller K.M. (2005) Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress*. **8**, 199–211.
36. Karin M., Chang L. (2001) AP-1–glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J. Endocrinol.* **169**, 447–451.
37. Itoi K., Motoike I., Liu Y., Clokie S., Iwasaki Y., Uchida K., Sato T., Aguilera G. (2019) Genome-wide analysis of glucocorticoid-responsive transcripts in the hypothalamic paraventricular region of male rats. *Endocrinology*. **160**, 38–54.
38. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* **89**, 535–606.
39. Daftary S.S., Boudaba C., Tasker J.G. (2000) Noradrenergic regulation of parvocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience*. **96**, 743–751.

40. Perez D.M. (2020) Alpha(1)-adrenergic receptors in neurotransmission, synaptic plasticity, and cognition. *Front. Pharmacol.* **11**, 581098.
41. Morris D.P., Lei B., Longo L.D., Bomsztyk K., Schwinn D.A., Michelotti G.A. (2015) Temporal dissection of rate limiting transcriptional events using Pol II ChIP and RNA analysis of adrenergic stress gene activation. *PLoS One.* **10**, e0134442.
42. Ang S.A., Harrison J.L., Powers-Martin K., Reddrop C., McKittrick D.J., Holobotovskyy V.V., Arnold L.F., Phillips J.K. (2007) C-Fos activation in renal hypertension. *Hypertension.* **49**, 1468–1468.
43. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Ilavazhagan G. (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Int.* **49**, 709–716.
44. Zafir A., Banu N. (2009) Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* **46**, 53–58.
45. Dal Santo G., Conterato G.M., Barcellos L.J., Rosemberg D.B., Piato A.L. (2014) Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neurosci. Lett.* **558**, 103–108.
46. Liu D., Ma Z., Xu L., Zhang X., Qiao S., Yuan J. (2019) PGC1alpha activation by pterostilbene ameliorates acute doxorubicin cardiotoxicity by reducing oxidative stress via enhancing AMPK and SIRT1 cascades. *Aging (Albany NY).* **11**, 10061–10073.
47. Zhao X., Liu F., Jin H., Li R., Wang Y., Zhang W., Wang H., Chen W. (2017) Involvement of PKCalpha and ERK1/2 signaling pathways in EGCG's protection against stress-induced neural injuries in Wistar rats. *Neuroscience.* **346**, 226–237.
48. Pang D., Yang C., Luo Q., Li C., Liu W., Li L., Zou Y., Feng B., Chen Z., Huang C. (2020) Soy isoflavones improve the oxidative stress induced hypothalamic inflammation and apoptosis in high fat diet-induced obese male mice through PGC1-alpha pathway. *Aging (Albany NY).* **12**, 8710–8727.
49. Lucas E.K., Dougherty S.E., McMeekin L.J., Reid C.S., Dobrunz L.E., West A.B., Hablitz J.J., Cowell R.M. (2014) PGC-1alpha provides a transcriptional framework for synchronous neurotransmitter release from parvalbumin-positive interneurons. *J. Neurosci.* **34**, 14375–14387.
50. Lin J., Wu P.H., Tarr P.T., Lindenberg K.S., St-Pierre J., Zhang C.Y., Mootha V.K., Jager S., Vianna C.R., Reznick R.M., Cui L., Manieri M., Donovan M.X., Wu Z., Cooper M.P., Fan M.C., Rohas L.M., Zavacki A.M., Cinti S., Shulman G.I., Lowell B.B., Krainc D., Spiegelman B.M. (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* **119**, 121–135.
51. Fan W., Evans R. (2015) PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **33**, 49–54.
52. Zhao Q., Zhang J., Wang H. (2015) PGC-1alpha overexpression suppresses blood pressure elevation in DOCA-salt hypertensive mice. *Biosci. Rep.* **35**, e00217.

## Restraint Stress-Induced Expression of *Fos* and Several Related Genes in the Hypothalamus of the Hypertensive ISIAH Rats

Yu. V. Makovka<sup>1, 2, \*</sup>, L. A. Fedoseeva<sup>1</sup>, D. Yu. Oshchepkov<sup>1</sup>,  
A. L. Markel<sup>1, 2</sup>, and O. E. Redina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

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

\*e-mail: makovkayv@bionet.nsc.ru

Stress can play a significant role in the development of arterial hypertension and many other complications of cardiovascular diseases. Considerable attention is paid to the study of the molecular mechanisms involved in the body's response to stressful influences, but there are still many blank spots in understanding the details. ISIAH rats model a stress-sensitive form of arterial hypertension. ISIAH rats are characterized by genetically determined enhanced hypothalamic-adrenal-cortical and sympathetic adrenomedullary systems activity, which suggests a functional state of increased stress reactivity. In the present study, for the first time, the time course of the *Fos* and several related genes' expression was studied in the hypothalamus of adult male hypertensive ISIAH rats after exposure to a single restraint stress of different duration (30, 60, and 120 minutes). The results of the study showed the activation of *Fos* transcription with a peak 1 hour after the onset of restraint stress. The dynamics of *Fos* gene activation coincides with the dynamics of blood pressure increase after stress. Restraint stress also alters the transcription of several other genes encoding transcription factors (*Jun*, *Nr4a3*, *Jdp2*, *Ppargc1a*) associated with the development of cardiovascular diseases. Since *Fos* induction is a marker of brain neuron activation, we can conclude that increased stress reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal systems of hypertensive ISIAH rats during short-term restriction is accompanied by activation of hypothalamic neurons and increased blood pressure level.

**Keywords:** immediate early genes, hypothalamus, single restraint stress, ISIAH rat strain



УДК 575:599.9

## ГРУППА НОВЫХ ГИПЕРМЕТИЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ И ПРОГРЕССИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. Е. А. Филиппова<sup>а</sup>, \*, В. И. Логинов<sup>а</sup>, С. С. Лукина<sup>а</sup>, А. М. Бурдённый<sup>а</sup>,  
И. В. Пронина<sup>а</sup>, Т. П. Казубская<sup>б</sup>, Э. А. Брага<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>б</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения России, Москва, 115478 Россия

\*e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 30.08.2023 г.

Рак молочной железы (РМЖ) – самый распространенный вид рака у женщин, поэтому крайне актуальным остается изучение механизмов метастазирования, основной причины смерти при этом заболевании, а также поиск новых маркеров ранней диагностики и прогноза РМЖ. Выявление механизмов регуляции генов с участием некодирующих РНК, в частности длинных некодирующих РНК (днРНК), открывает новые перспективы в диагностике и терапии РМЖ. В настоящей работе уровень метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAG12-AS3* и *PLUT*) проанализирован методом количественной метилспецифичной ПЦР на выборке из 79 парных (опухоль/норма) образцов РМЖ. Выявлено гиперметилирование всех семи генов днРНК, причем гиперметилирование *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAG12-AS3* и *PLUT* обнаружено нами при РМЖ впервые. Установлено, что уровень метилирования исследованных генов днРНК статистически значимо коррелировал со стадией опухолевого процесса, размером опухоли, а также с наличием метастазов в лимфатических узлах. Таким образом, метилирование семи исследованных генов днРНК ассоциировано с процессами развития и прогрессии РМЖ, и эти гены можно рассматривать как потенциальные диагностические и прогностические маркеры РМЖ.

**Ключевые слова:** гены длинных некодирующих РНК, метилирование ДНК, рак молочной железы  
**DOI:** 10.31857/S0026898424010085, **EDN:** ODZLJB

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным общемировой статистики за 2020 год, рак молочной железы (РМЖ) вышел на первое место по заболеваемости эпителиальными опухолями, опережая рак легкого, и представляет главную причину смертности от онкопатологии среди женщин во всем мире [1]. Молекулярные различия между гистологически сходными опухолями затрудняют возможность прогноза клинического исхода при РМЖ [2], а также препятствуют созданию лучшей молекулярной классификации и проведению персонализированной терапии. Метастазы и рецидивы являются основными причинами смерти от РМЖ [3], причем смертность от отдаленных метастазов значительно выше, чем от лимфогенного метастазирования [4].

Важную роль в патогенезе и прогрессировании РМЖ играют как генетические, так и эпи-

генетические факторы [5]. Эпигенетическая регуляция включает модификацию ДНК посредством метилирования, ковалентные модификации гистонов и ремоделирование хроматина, а также регуляцию генов с участием некодирующих РНК, открытых в последние 20 лет [6]. Тонкая эпигенетическая регуляция очень важна для стабильности генома и более динамичной его реализации, в то время как нарушение регуляции эпигенетических механизмов может приводить к возникновению опухолей, в частности РМЖ [7, 8]. Так, установлено участие микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК) в дерегуляции генов-мишеней при РМЖ и в опухолях других локализаций [9, 10].

ДнРНК – это длинные некодирующие РНК, состоящие более чем из 200 нуклеотидов, которые транскрибируются РНК-полимеразой II и распределяются в цитоплазме и ядре, вы-

полняя разнообразные биологические функции [11]. днРНК вовлечены в развитие и прогрессирование различных видов рака, участвуя в регуляции генов на разных уровнях, включая эпигенетический, транскрипционный и посттранскрипционный, они признаны новыми биомаркерами рака [12, 13]. В последние годы актуальными стали также вопросы эпигенетической регуляции самих регуляторных днРНК, в частности метилирования промоторов генов днРНК. Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация, в которой ДНК-метилтрансфераза (DNMT) катализирует присоединение метильной группы к атому углерода в остатке цитозина в CpG-островках, которые присутствуют примерно в 70% промоторов генов человека, что препятствует прямому связыванию факторов транскрипции и сборке РНК-полимеразы II на промоторах. Аберрантное метилирование ДНК прямо или косвенно изменяет транскрипцию генов-супрессоров опухолевого роста и других факторов канцерогенеза, тем самым ускоряя развитие РМЖ [14, 15]. Снижение уровня метилирования ДНК, усиливающее экспрессию онкогенных днРНК, и специфичное повышение уровня метилирования генов супрессорных днРНК, подавляющее их экспрессию, вовлечены в инициацию злокачественной трансформации. Все большее число исследований показывает, что нарушение регуляции днРНК тесно связано с нарушением апоптоза, опухолевым ростом, метастазированием и резистентностью РМЖ к химиотерапии [16, 17]. Таким образом, актуальным представляется изучение вовлеченности днРНК в патогенез РМЖ и механизмы метастазирования, поиск на их основе новых терапевтических мишеней. Крайне важен также поиск неинвазивных биомаркеров, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью, которые можно использовать для выявления РМЖ на ранней стадии и мониторинга ответа на терапию.

Цель данной работы состояла в определении изменений уровня метилирования группы генов днРНК в опухолях больных РМЖ и в оценке возможной связи этих изменений с развитием и прогрессией РМЖ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы РМЖ** собраны и клинически и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на основании классификации ВОЗ [18]. Клинико-патоморфологические характеристики 79 образцов РМЖ представлены в табл. 1.

В исследовании использовали образцы РМЖ, полученные от больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [19]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили при -70°C. Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX (“IKA”, Китай).

**Высокомолекулярную ДНК** выделяли из тканей по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. ДНК хранили при -20°C. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (“Thermo Scientific”, США). Концентрация составила от 250 до 550 нг/мкл,  $A_{260}/A_{280} = 2.10–2.35$ ;  $A_{260}/A_{230} = 2.15–2.40$ . Целостность ДНК оценивали с использовани-

**Таблица 1.** Клинико-патоморфологические параметры образцов РМЖ

Клинико-патоморфологический параметр		Количество образцов
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	53
	III стадия	25
Размер первичной опухоли	T1	18
	T2	46
	T3	7
	T4	7
Лимфогенное метастазирование	Есть	42
	Нет	36

ем электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией.

**Уровень метилирования генов днРНК** анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специ-

фичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР-РВ), как описано в работе [20]. Амплификацию проводили на системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом с использованием набора qPCRMix-HS SYBR по протоколу компании “Евроген” (Россия).

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры МС-ПЦР и количественной МС-ПЦР

Ген днРНК	Последовательности олигонуклеотидов <sup>a</sup> , 5'→3'	$T_{отж}$ , °C	Размер ампликона, п.н.
<i>MEG3</i>	MF: CGTTAAGTTCGTATTTTTTCGATGGATGTT	60	185
	MR: CGCGAATACTTTTTCCCTACGTAACC		
	UF: TGATGGATGTTTTGAAATTGTTAGGTGTG	60	165
	UR: САААТАСТТТТСССТАСАТАААСССААСТСА		
<i>SEMA3B-AS1</i>	MF: CCACTCCC GCCTAACTACCG	54	91
	MR: ATCGTTCGTGTCGTGCGTAAAGT		
	UF: ACTCCCACCTAACTACCA	46	90
	UR: TATTGTTTGTGTGTTGTAA		
<i>HAND2-AS1</i>	MF: CGAGGTTGGTACGCGGAG	60	121
	MR: CCGACACA ACTAAACCGACTC		
	UF: TGGGGTTTTTGTGAGGTTGGTATGT	60	134
	UR: CCCCAACACA ACTAAACCAACTCCTC		
<i>KCNK15-AS1</i>	MF: CGGTGATGGCGAAGTAGAAGGAGT	60	182
	MR: CGAATCCGAAACGAAAAACGACC		
	UF: GATGATGGTGATGGTGAAGTAGAAGGAGT	60	163
	UR: CCAACA ACTACTAATCCAAAAACA AAAACTC		
<i>ZNF667-AS1</i>	MF: AGGCGCGAGTTTATCGTTTAC	60	254
	MR: ACGCGCGATCCCGAAAT		
	UF: AGGTGTGAGTTTATTGTTTATGTA	58	260
	UR: AACACACAATCCCAAAATCCC		
<i>MAGI2-AS3</i>	MF: CGGAGCGAGTAGTAGTCGAGTTGGT	60	276
	MR: CGACGAAACCCTCCGTA ACTCC		
	UF: TGGAGTGAGTAGTAGTTGAGTTGGTGAGTG	59.4	330
	UR: CTCTCTCTACCTTCACTACCAATCAA ACTAC		
<i>PLUT</i>	MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC	60	201
	MR: СТАААССТААССТСТТААТАСГАССААССА		
	UF: TGTGGAATGTGTATGGGTTTTTGTAAGTT	61	339
	UR: САСААТАССТАААССТААССТСТТААТАСАССА		

<sup>a</sup> MF/UF – прямые праймеры к метилированному/неметилированному аллелю, MR/UR – обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю.

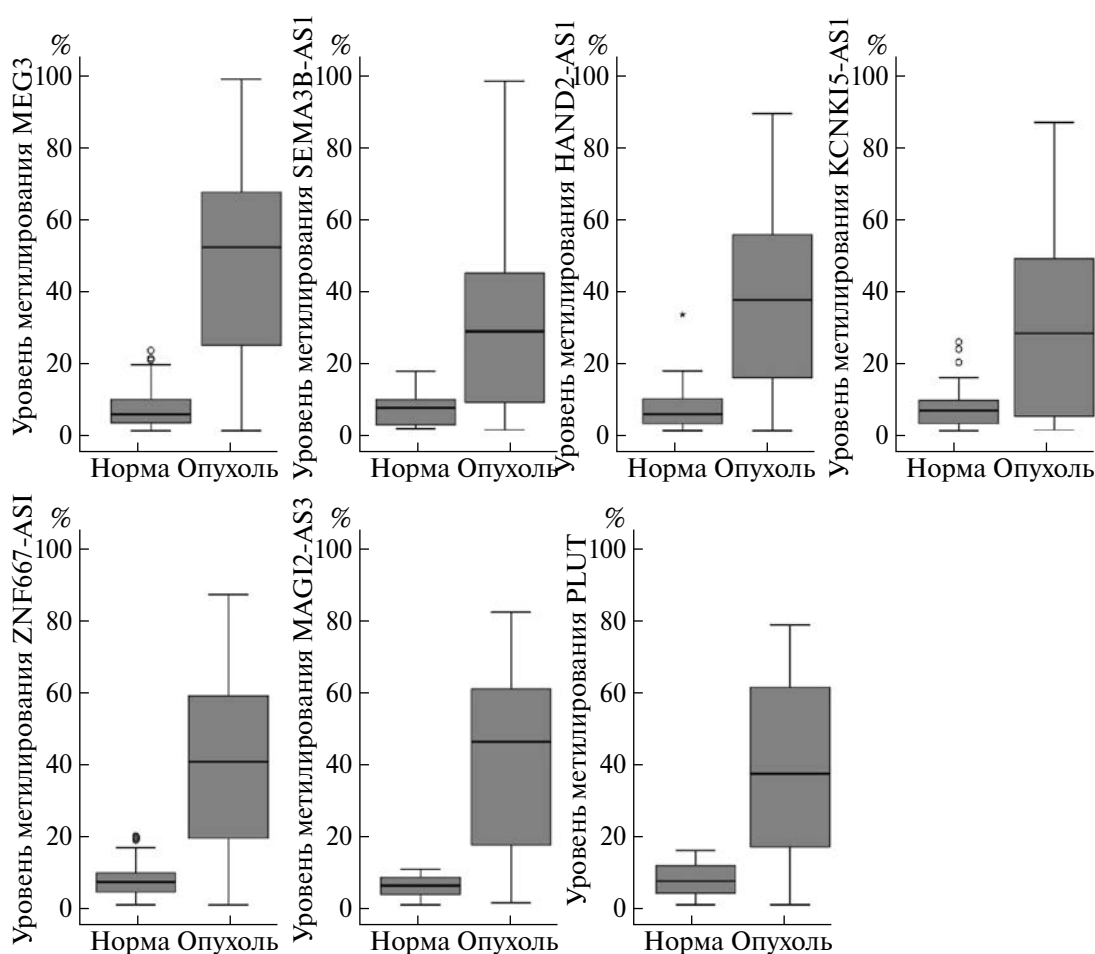
Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании “DNASTAR”. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* приведены в табл. 2. Для контрольного локуса *ACTB1* использованы олигонуклеотиды из работы [21]. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК (#G1471; “Promega”, США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК (#SD1131; “Thermo Fisher Scientific”, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в программной среде R. Значимость различий между исследуемыми группами оценивали с использованием

непараметрического U-теста Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ . Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ уровней метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) проведен нами на выборке из 79 парных образцов РМЖ. Обнаружено статистически значимое ( $p < 0.001$ ) увеличение уровня метилирования всех семи генов в опухолевой ткани молочной железы по сравнению с нормальной (рис. 1). Гиперметилирование четырех генов (*HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) при РМЖ показано нами впервые. Эти данные указывают на вовлеченность метилирования семи генов днРНК в патогенез РМЖ.



**Рис. 1.** Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы и парных к ним нормальных тканях. 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”.

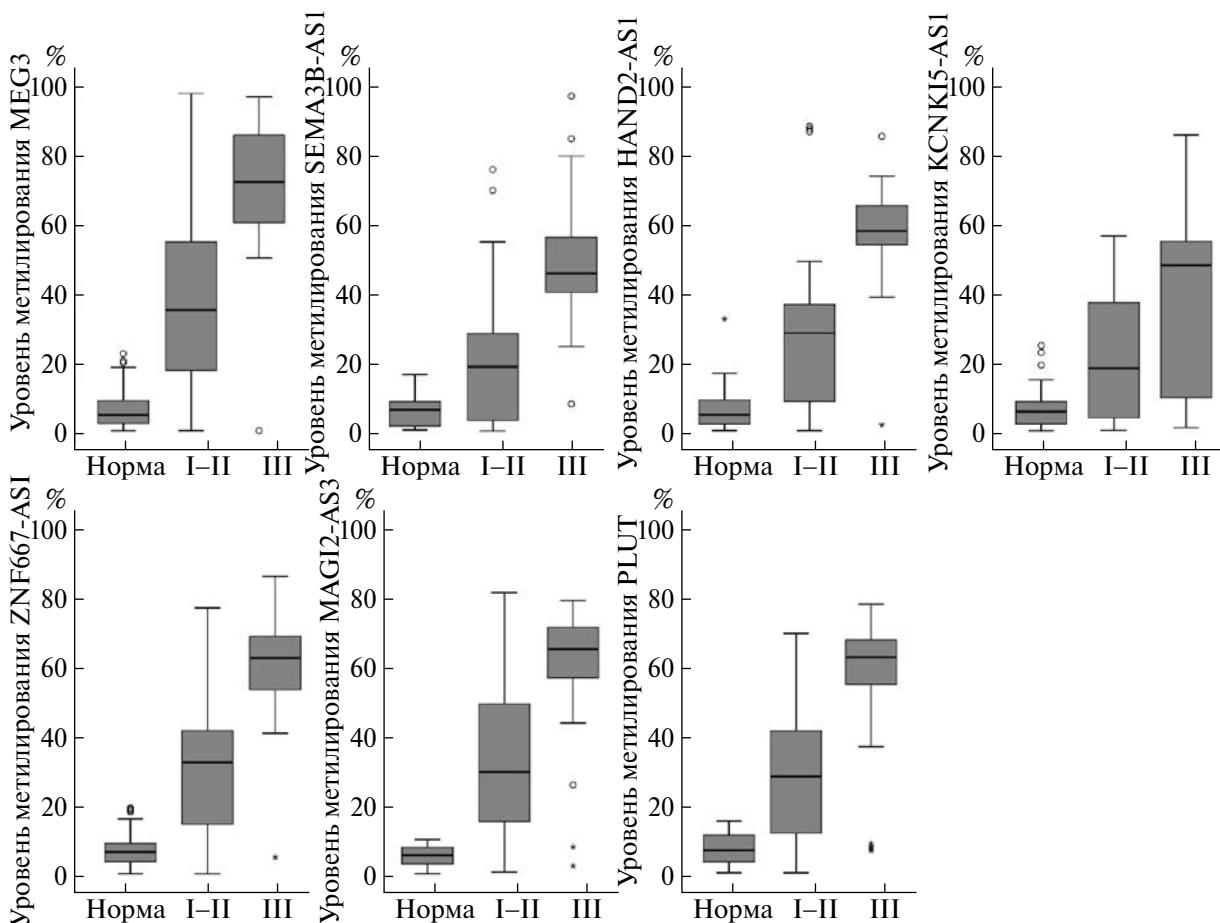


Рис. 2. Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы на поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями РМЖ (I–II) и нормальными тканями.

Данные по метилированию генов днРНК при РМЖ были сопоставлены с клинико-патоморфологическими характеристиками образцов больных РМЖ. Выявлено статистически значимое ( $p < 0.001$ ) увеличение уровня метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) (рис. 2) на более поздней стадии РМЖ (III) по сравнению с ранними стадиями (I–II), а также при увеличении размера опухоли ( $p < 0.01$ ).

Для оценки вовлеченности генов днРНК в инициацию развития РМЖ нами были сопоставлены две группы образцов: 53 образца РМЖ с ранними стадиями (I–II) и 79 образцов гистологически неизменной ткани молочной железы. Показано значимое ( $p < 0.005$ ) увеличение уровня метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в образцах с I–II стадией онкологического процесса по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 2).

При сравнении уровня метилирования в образцах РМЖ без метастазов ( $N_0$ ) и в образцах с метастазами в лимфатических узлах ( $N_1$ – $N_3$ ) нами также выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования всех семи генов днРНК: *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* (рис. 3).

При сопоставлении уровня метилирования генов днРНК со степенью дифференцировки опухолевых клеток выявлено статистически значимое ( $p = 0.03$ ) снижение уровня метилирования гена днРНК *SEMA3B-AS1* при увеличении уровня дифференцировки клеток РМЖ.

Проведен анализ изменения уровня метилирования генов днРНК в зависимости от иммуногистохимического статуса опухоли (экспрессия ER, PR, Her2/neu, Ki67).

Выявлено статистически значимое ( $p = 0.04$ ) увеличение уровня метилирования гена днРНК *PLUT* в опухолях молочной железы, экспрессирующих рецепторы прогестерона и эстрогена ( $PR^+$ ,  $ER^+$ ) (рис. 4).

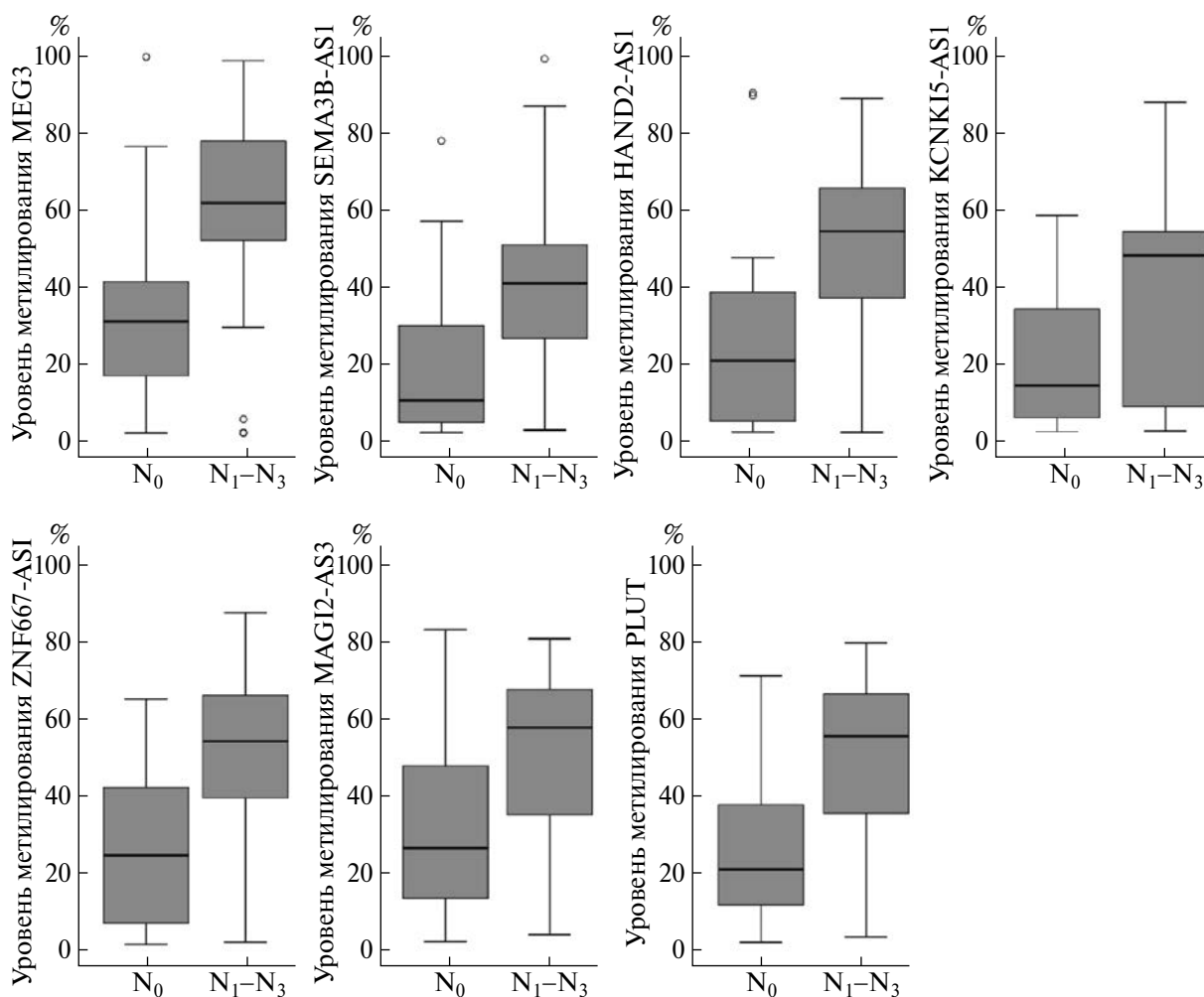


Рис. 3. Уровень метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAG12-AS3* и *PLUT* в образцах опухолей молочной железы с метастазами ( $N_1-N_3$ ) и без метастазов ( $N_0$ ).

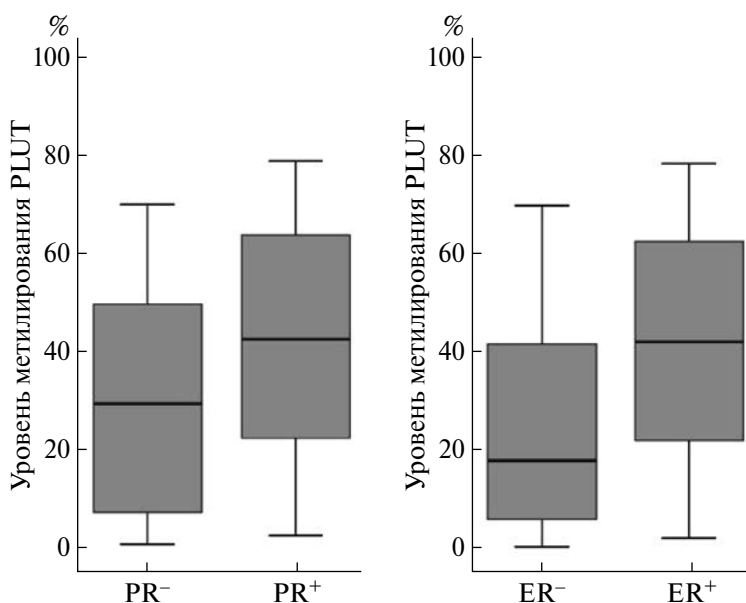


Рис. 4. Уровень метилирования гена днРНК *PLUT* в образцах опухолей молочной железы, не экспрессирующих рецепторы прогестерона (PR<sup>-</sup>) и эстрогена (ER<sup>-</sup>) и экспрессирующих рецепторы прогестерона (PR<sup>+</sup>) и эстрогена (ER<sup>+</sup>).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе впервые установлено гиперметилирование четырех генов днРНК (*HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в образцах РМЖ и показана вовлеченность метилирования семи генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) в развитие и прогрессию РМЖ. Эти данные указывают на участие данных днРНК в патогенезе РМЖ и позволяют предполагать их супрессорную роль.

Метилирование генов *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* при РМЖ было показано ранее [22–24]. В единичных работах сообщается о гиперметилировании гена днРНК *MEG3* при РМЖ, причем предотвращение метилирования *MEG3* может иметь значение для снижения химиорезистентности опухолей молочной железы, так как днРНК *MEG3* препятствует пролиферации и метастазированию опухолевых клеток [22, 25]. Аберрантное метилирование гена днРНК *MEG3* показано и при раке яичников, который, как и РМЖ, относится к гормонозависимым видам рака [26].

Ранее мы показали увеличение уровня метилирования *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* в опухолевой ткани молочной железы по сравнению с парной нормальной тканью, а также корреляцию высокого уровня метилирования с более поздними стадиями РМЖ на меньшей выборке [22], что получило подтверждение в текущем исследовании на большей выборке образцов. Сообщается о снижении уровня экспрессии *ZNF667-AS1* на ранней стадии канцерогенеза молочной железы, предположительно во время клеточной иммортализации, предшествующей развитию инвазивного люминального РМЖ [23].

Результаты проведенного нами анализа гиперметилирования генов *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и *ZNF667-AS1* согласуются с данными о супрессорных функциях днРНК, кодируемых этими генами, и подчеркивают важную роль их метилирования в развитии и прогрессии РМЖ [22, 25, 27, 28].

Метилирование генов *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT* ранее обнаружено и в опухолях других локализаций. Например, анализ депонированных в базу TCGA данных о метилировании полного генома человека выявил очевидное гиперметилирование островков CpG122 и CpG74 в промоторной области генов *HAND2-AS1* и *HAND2* в тканях рака эндометрия [29]. Отмечено также [30], что снижение экспрессии гена *HAND2-AS1* вызвано гиперметилированием промотора, и этот ген действует как супрессор опухолевого роста в клеточных линии

ях высокозлокачественной серозной карциномы яичника.

Метилирование промотора гена *KCNK15-AS1* обнаружено при раке желудка, причем частота метилирования на более поздних стадиях заболевания была выше, чем на ранних [31].

Гиперметилирование промотора гена *MAGI2-AS3*, опосредованное активацией DNMT1, приводит к снижению экспрессии *MAGI2-AS3* при плоскоклеточном раке гортани, тем самым способствуя пролиферации, миграции и инвазии клеток посредством эпителиально-мезенхимального перехода [32].

Гиперметилирование промотора гена днРНК *PLUT* является прогностическим фактором у пациентов с ранней (I) стадией аденокарциномы легкого с высоким риском раннего рецидива [33].

Специфичное гиперметилирование промоторных участков генов часто приводит к потере или снижению их функции, что характерно для супрессоров опухолевого роста. Рассмотренные нами гены днРНК проявляют в РМЖ главным образом супрессорные свойства. Так, известно, что механизмы, посредством которых *MEG3* проявляет супрессорные свойства, включают активацию путей p53 и Rb при одновременном ингибировании их негативного регулятора MDM2 [34]. *MEG3* участвует в ингибировании эпителиально-мезенхимального перехода, связывая miR-421, как “губка”, и впоследствии усиливая регуляцию E-кадгерина, что приводит к снижению белков клеточной инвазии [35]. Кроме того, *MEG3* принимает участие в предотвращении ангиогенеза, регуляции сигнальных путей PI3K/Akt и Wnt/ $\beta$ -катенин [36]. Таким образом, *MEG3* ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток. Соответственно, эпигенетические изменения в промоторе гена *MEG3* препятствуют выполнению ее функций.

Установлено, что днРНК *SEMA3B-AS1* действует как новый супрессор РМЖ; снижение экспрессии этой днРНК коррелирует с повышенным метастазированием и плохим прогнозом у пациентов с РМЖ [27]. Определен новый путь прогрессирования трижды негативного РМЖ через ось SMAD3/*SEMA3B-AS1*/miR-3940-3p/KLLN. Предполагается, что *SEMA3B-AS1* может служить потенциальным биомаркером и терапевтической мишенью при трижды негативном РМЖ.

ДнРНК *ZNF667-AS1* препятствует пролиферации опухолевых клеток, метастазированию и ангиогенезу рака желудка в результате активации экспрессии E-кадгерина и ингибирования экспрессии N-кадгерина и VEGFA, т.е. действу-

ет как опухолевый супрессор [28]. Кроме того, днРНК ZNF667-AS1, связывая, как “губка”, miR-1290, способствует экспрессии ABLIM1, тем самым подавляя прогрессирование рака носоглотки [37]. Сверхэкспрессия ZNF667-AS1 может ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию клеток колоректального рака, что может быть связано с высоким уровнем экспрессии ANK2 и низким уровнем JAK2 [38].

Показано снижение экспрессии MAGI2-AS3 в тканях РМЖ по сравнению с нормальными тканями и отмечено, что MAGI2-AS3 может действовать как супрессор опухолевого роста, нацеленный на путь Fas/FasL, и подавлять пролиферацию клеток РМЖ [39]. Возможно, что MAGI2-AS3 модулирует экспрессию Fas/FasL путем взаимодействия с микроРНК. Таким образом, MAGI2-AS3 может быть потенциальной терапевтической мишенью при РМЖ. Сообщается также о супрессорных свойствах MAGI2-AS3 и при раке предстательной железы, где ингибирование прогрессирования опухоли достигается путем нацеливания на miR-142-3p [40]. При раке мочевого пузыря MAGI2-AS3 в основном взаимодействует с CCDC19, подавляя миграцию, пролиферацию и инвазию раковых клеток [41]. При гепатоцеллюлярной карциноме MAGI2-AS3 действует на miR-374b-5p/SMG1 и подавляет пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [42]. При немелкоклеточном раке легкого MAGI2-AS3 действует как супрессор опухоли, выступая в качестве “губки” для miR-25, а взаимодействие между MAGI2-AS3 и miR-25 приводит к увеличению экспрессии RECK – мишени miR-25 [43].

Однако сообщается, что MAGI2-AS3 способствует миграции и инвазии клеток, связываясь с miR-141/200a и повышая экспрессию ZEB1, что позволяет предположить ее онкогенную роль в прогрессировании рака желудка [44]. По-видимому, можно говорить о двойственных чертах этой днРНК.

Обнаружено, что днРНК HAND2-AS1 служит “губкой” для miR-3118, уровень экспрессии которой повышен в клеточных линиях РМЖ [45]. Таким образом, днРНК HAND-AS1 препятствует прогрессированию РМЖ за счет снижения экспрессии miR-3118. Кроме того, днРНК HAND2-AS1 ингибирует процесс развития РМЖ, усиливая экспрессию PHLPP2 – нижестоящей мишени miR-3118. Таким образом, HAND2-AS1 подавляет развитие РМЖ, действуя на ось miR-3118/PHLPP2, что позволяет рассматривать HAND2-AS1 как потенциальную терапевтическую мишень при РМЖ [45]. Следует отметить, что днРНК HAND2-AS1 проявляет супрессорные свойства и при других видах опу-

холей, например при колоректальном раке [46], раке пищевода [47] и раке яичников [48].

Лишь в единственной работе [49] сообщается, что HAND2-AS1 оказывает онкогенное действие, способствуя самообновлению стволовых клеток рака печени.

днРНК KCNK15-AS1, связываясь с мРНК KCNK15, ингибирует ее трансляцию и, взаимодействуя с MDM2, вызывает убиквитинирование REST, что способствует транскрипции *P TEN* и инактивации АКТ-пути при раке поджелудочной железы [50]. В итоге KCNK15-AS1 подавляет пролиферацию, миграцию и эпителиально-мезинхимальный переход клеток рака поджелудочной железы.

Однако сообщается о сверхэкспрессии KCNK15-AS1 в тканях аденокарциномы легкого, а также о корреляции между высоким уровнем экспрессии KCNK15-AS1 и плохим прогнозом при этом виде рака [51]. Предполагается, что при раке легкого KCNK15-AS1 функционирует как онкоген, регулируя ось miR-202/miR-370/EGFR.

Следовательно, исследуемые нами гены днРНК могут играть роль и супрессоров опухолевого роста, и онкогенов в зависимости от микроокружения опухоли.

Показана возможность клинического использования некоторых гиперметилованных генов днРНК. Так, метилирование гена *MEG3* в плазме крови может служить диагностическим и прогностическим биомаркером рака шейки матки [52].

Необходимо более углубленное изучение генов-мишеней этих днРНК, регулируемых метилированием. Предварительный биоинформатический анализ, выполненный нами с применением баз данных RNAInter (<http://www.rnainter.org/>) и LncRRISearch (<http://rtools.cbrc.jp/LncRRISearch/>), показал, что возможными мишенями днРНК HAND2-AS1 могут быть мРНК генов *HIF1A* и *BCL2*, которые играют существенную роль в ангиогенезе и апоптозе.

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с опухолесупрессорными функциями семи днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3* и *PLUT*) и дополняют опубликованные данные о важной роли гиперметилования их генов в развитии и прогрессии РМЖ. Однако требуется дальнейшее изучение функций и молекулярных механизмов действия этих днРНК, в частности выяснения факторов, определяющих их двойственную роль и как супрессоров, и как онкогенов в разных видах рака.



Следует подчеркнуть, что метилирование промоторных CpG-островков этих генов вносит вклад в дерегуляцию исследуемых днРНК и непосредственно влияет на функции этой группы днРНК, участвующих в различных сигнальных путях.

Кроме того, исследованные гиперметилированные гены днРНК могут рассматриваться как потенциальные диагностические и прогностические биомаркеры и терапевтические мишени при РМЖ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 22-75-00132).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам Институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протоколы заседаний № 1 от 03.03.2022 и № 4 от 31.08.2023). От всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в работе.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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
- Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* **490**(7418), 61–70. doi: 10.1038/nature11412
- Cuzick J. (2017) Preventive therapy for cancer. *Lancet Oncol.* **18**(8), 472–482. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30536-3
- Harbeck N., Gnant M. (2017) Breast cancer. *Lancet.* **389**(10074), 1134–1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8
- Rahman M.M., Brane A.C., Tollefsbol T.O. (2019) MicroRNAs and epigenetics strategies to reverse breast cancer. *Cells.* **8**(10), 1214. doi: 10.3390/cells8101214
- Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* **31**(1), 27–36. doi: 10.1093/carcin/bgp220
- Rose M., Klotten V., Noetzel E., Gola L., Ehling J., Heide T., Meurer S.K., Gaiko-Shcherbak A., Sechi A.S., Huth S., Weiskirchen R., Klaas O., Antonopoulos W., Lin Q, Wagner W., Veeck J., Gremse F., Steitz J., Knüchel R., Dahl E. (2017) ITIH5 mediates epigenetic reprogramming of breast cancer cells. *Mol. Cancer.* **16**(1), 44. doi: 10.1186/s12943-017-0610-2
- Jeong G.Y., Park M.K., Choi H.J., An H.W., Park Y.U., Choi H.J., Park J., Kim H.Y., Son T., Lee H., Min K.W., Oh Y.H., Lee J.Y., Kong G. (2021) NSD3-Induced methylation of H3K36 activates NOTCH signaling to drive breast tumor initiation and metastatic progression. *Cancer Res.* **81**(1), 77–90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0360
- Klinge C.M. (2018) Non-coding RNAs: long non-coding RNAs and microRNAs in endocrine-related cancers. *Endocr. Relat. Cancer.* **25**(4), 259–282. doi: 10.1530/ERC-17-0548
- Venkatesh J., Wasson M.D., Brown J.M., Fernando W., Marcato P. (2021) LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack. *Cancer Lett.* **509**, 81–88. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.002
- Fazal F.M., Chang H.Y. (2016) lncRNA structure: message to the heart. *Mol. Cell.* **64**(1), 1–2. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.030
- Kim J., Piao H.L., Kim B.J., Yao F., Han Z., Wang Y., Xiao Z., Siverly A.N., Lawhon S.E., Ton B.N., Lee H., Zhou Z., Gan B., Nakagawa S., Ellis M.J., Liang H., Hung M.C., You M.J., Sun Y., Ma L. (2018) Lo . *J. Cancer.* **108**(12), 2419–2425. doi: 10.1038/bjc.2013.233
- Huang J., Zhang S.Y., Gao Y.M., Liu Y.F., Liu Y.B., Zhao Z.G., Yang K. (2014) MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Cell Prolif.* **47**(4), 277–286. doi: 10.1111/cpr.12109
- Union for International Cancer Control (UICC) (2017) TNM Classification of Malignant Tumours. Eds Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford, UK: John Wiley and Sons, 241 p.
- 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
- Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny 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
- Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. (2008) A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal. Biochem.* **377**(1), 62–71. doi: 10.1016/j.ab.2008.03.014
- Selezneva A.D., Filippova E.A., Selezneva A.D., Lukina S.S., Pronina I.V., Ivanova N.A., Kazubskaya T.P., Burdenny A.M., Braga E.A., Loginov V.I.

- (2022) Hypermethylation of long non-coding RNA genes group in the breast cancer development and progression. *Bull. Exp. Biol. Med.* **173**(6), 765–769. doi: 10.1007/s10517-022-05627-8
23. Vrba L., Futscher B.W. (2017) Epigenetic silencing of MORT is an early event in cancer and is associated with luminal, receptor positive breast tumor subtypes. *J. Breast Cancer.* **20**(2), 198–202. doi: 10.4048/jbc.2017.20.2.198
  24. Di Fiore R., Suleiman S., Drago-Ferrante R., Felix A., O'Toole S.A., O'Leary J.J., Ward M.P., Beirne J., Yordanov A., Vasileva-Slaveva M., Subbannayya Y., Pentimalli F., Giordano A., Calleja-Agius J. (2021) LncRNA MORT (ZNF667-AS1) in cancer-is there a possible role in gynecological malignancies? *Int. J. Mol. Sci.* **22**(15), 7829. doi: 10.3390/ijms22157829
  25. Li H., Wang P., Liu J., Liu W., Wu X., Ding J., Kang J., Li J., Lu J., Pan G. (2020) Hypermethylation of lncRNA MEG3 impairs chemosensitivity of breast cancer cells. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**(9), e23369. doi: 10.1002/jcla.23369
  26. Burdenny A.M., Filippova E.A., Ivanova N.A., Lukina S.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Utkin D.O., Braga E.A., Kushlinskii N.E. (2021) Hypermethylation of genes in new long noncoding RNA in ovarian tumors and metastases: a dual effect. *Bull. Exp. Biol. Med.* **171**(3), 370–374. doi: 10.1007/s10517-021-05230-3
  27. Hu J., Huang H., Xi Z., Ma S., Ming J., Dong F., Guo H., Zhang H., Zhao E., Yao G., Yang L., Zhang F., Zheng W., Chen H., Huang T., Li L. (2022) LncRNA SEMA3B-AS1 inhibits breast cancer progression by targeting miR-3940/KLLN axis. *Cell Death Dis.* **13**(9), 800. doi: 10.1038/s41419-022-05189-7
  28. Yu C., Chen W., Cai Y., Du M., Zong D., Qian L., Jiang X., Zhu H. (2022) The lncRNA ZNF667-AS1 inhibits propagation, invasion, and angiogenesis of gastric cancer by silencing the expression of N-cadherin and VEGFA. *J. Oncol.* 2022–3579547. doi: 10.1155/2022/3579547
  29. Yang X., Wang C.C., Lee W.Y.W., Trovik J., Chung T.K.H., Kwong J. (2018) Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U. *Cancer Lett.* **28**(413), 23–34. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.028
  30. 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
  31. Zhang H., Zhang Z., Wang D. (2019) Epigenetic regulation of lncRNA KCNKI5-AS1 in gastric cancer. *Cancer Manag. Res.* **11**, 8589–8602. doi: 10.2147/CMAR.S186002
  32. Wang J., Yang C., Cao H., Yang J., Meng W., Yu M., Yu L., Wang B. (2023) Hypermethylation-mediated lncRNA MAGI2-as3 downregulation facilitates malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma via interacting with SPT6. *Cell Transplant.* **32**, 9636897231154574. doi: 10.1177/09636897231154574
  33. Kim-Wanner S.Z., Assenov Y., Nair M.B., Weichenhan D., Benner A., Becker N., Landwehr K., Kuner R., Sültmann 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 noncoding RNA PLUT: an exploratory study. *J. Thorac. Oncol.* **15**(8), 1338–1350. doi: 10.1016/j.jtho.2020.03.023
  34. Al-Rugeebah A., Alanazi M., Parine N.R. (2019) MEG3: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **25**(3), 859–874. doi: 10.1007/s12253-019-00614-3
  35. Zhang W., Shi S., Jiang J., Li X., Lu H., Ren F. (2017) LncRNA MEG3 inhibits cell epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-421 targeting E-cadherin in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **91**, 312–319. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.085
  36. Zhang L., Liang X., Li Y. (2017) Long non-coding RNA MEG3 inhibits cell growth of gliomas by targeting miR-93 and inactivating PI3K/AKT pathway. *Oncol. Rep.* **38**(4), 2408–2416. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5871>
  37. Chen X., Huang Y., Shi D., Nie C., Luo Y., Guo L., Zou Y., Xie C. (2020) LncRNA ZNF667-AS1 promotes ABLIM1 expression by adsorbing microRNA-1290 to suppress nasopharyngeal carcinoma cell progression. *Oncotargets Ther.* **20**(13), 4397–4409. doi: 10.2147/OTT.S245554
  38. Zhuang L., Ding W., Ding W., Zhang Q., Xu X., Xi D. (2021) lncRNA ZNF667-AS1 (NR\_036521.1) inhibits the progression of colorectal cancer via regulating ANK2/JAK2 expression. *J. Cell. Physiol.* **236**(3), 2178–2193. doi: 10.1002/jcp.30004
  39. Yang Y., Yang H., Xu M., Zhang H., Sun M., Mu P., Dong T., Du S., Liu K. (2018) Long non-coding RNA (lncRNA) MAGI2-AS3 inhibits breast cancer cell growth by targeting the Fas/FasL signalling pathway. *Hum. Cell.* **31**(3), 232–241. doi: 10.1007/s13577-018-0206-1
  40. Hu R., Wu P., Liu J. (2022) LncRNA MAGI2-AS3 inhibits prostate cancer progression by targeting the miR-142-3p. *Hormon. Metab Res.* **54**(11), 754–759. doi: 10.1055/a-1891-6864
  41. Wang F., Zu Y., Zhu S., Yang Y., Huang W., Xie H., Li G. (2018) Long noncoding RNA MAGI2-AS3 regulates CCDC19 expression by sponging miR-15b-5p and suppresses bladder cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun.* **507**(1–4), 231–235. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.013
  42. Yin Z., Ma T., Yan J., Shi N., Zhang C., Lu X., Hou B., Jian Z. (2019) LncRNA MAGI2-AS3 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting the miR-374b-5p/SMG1 signaling pathway. *J. Cell Physiol.* **234**(10), 18825–18836. doi: 10.1002/jcp.28521

43. Sui Y., Chi W., Feng L., Jiang J. (2020) LncRNA MAGI2-AS3 is downregulated in non-small cell lung cancer and may be a sponge of miR-25. *BMC Pulmonol. Med.* **20**(1), 59. doi: 10.1186/s12890-020-1064-7
44. Li D., Wang J., Zhang M., Hu X., She J., Qiu X., Zhang X., Xu L., Liu Y., Qin S. (2020) LncRNA MAGI2-AS3 is regulated by BRD4 and promotes gastric cancer progression via maintaining ZEB1 overexpression by sponging miR-141/200a. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **19**, 109–123. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.003
45. Dong G., Wang X., Jia Y., Jia Y., Zhao W., Zhang J., Tong Z. (2020) HAND2-AS1 works as a ceRNA of miR-3118 to suppress proliferation and migration in breast cancer by upregulating PHLPP2. *Biomed. Res. Int.* **2020**, 8124570. doi: 10.1155/2020/8124570
46. Jiang Z., Li L., Hou Z., Liu W., Wang H., Zhou T., Li Y., Chen S. (2020) LncRNA HAND2-AS1 inhibits 5-fluorouracil resistance by modulating miR-20a/PDCD4 axis in colorectal cancer. *Cell. Signal.* **66**, 109483.
47. Yan Y., Li S., Wang S., Rubegni P., Tognetti L., Zhang J., Yan L. (2019) Long noncoding RNA HAND2-AS1 inhibits cancer cell proliferation, migration, and invasion in esophagus squamous cell carcinoma by regulating microRNA-21. *J. Cell. Biochem.* **120**(6), 9564–9571.
48. Chen J., Lin Y., Jia Y., Xu T., Wu F., Jin Y. (2019) LncRNA HAND2-AS1 exerts antioncogenic effects on ovarian cancer via restoration of BCL2L1 as a sponge of microRNA-340-5p. *J. Cell. Physiol.* **234**, 23421–23436. <https://doi.org/10.1002/jcp.28911>
49. Wang Y., Zhu P., Luo J., Wang J., Liu Z., Wu W., Du Y., Ye B., Wang D., He L., Ren W., Wang J., Sun X., Chen R., Tian Y., Fan Z. (2019) LncRNA HAND2-AS1 promotes liver cancer stem cell self-renewal via BMP signaling. *EMBO J.* **38**(17), e101110. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101110>
50. He Y., Yue H., Cheng Y., Ding Z., Xu Z., Lv C., Wang Z., Wang J., Yin C., Hao H., Chen C. (2021) ALKBH5-mediated m6A demethylation of KCNK15-AS1 inhibits pancreatic cancer progression via regulating KCNK15 and PTEN/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **12**(12), 1121. doi: 10.1038/s41419-021-04401-4
51. Peng J., Chen X.L., Cheng H.Z., Xu Z.Y., Wang H., Shi Z.Z., Liu J., Ning X.G., Peng H. (2019) Silencing of KCNK15-AS1 inhibits lung cancer cell proliferation via upregulation of miR-202 and miR-370. *Oncol. Lett.* **18**(6), 5968–5976. doi: 10.3892/ol.2019.10944
52. Zhang J., Yao T., Lin Z., Gao Y. (2017) Aberrant methylation of MEG3 functions as a potential plasma-based biomarker for cervical cancer. *Sci. Rep.* **7**(1), 6271. doi: 10.1038/s41598-017-06502-7

## A Group of New Hypermethylated Long Non-Coding RNA Genes Associated with the Development and Progression of Breast Cancer

E. A. Filippova<sup>1,\*</sup>, V. I. Loginov<sup>1</sup>, S. S. Lukina<sup>1</sup>, A. M. Burdenny<sup>1</sup>,  
I. V. Pronina<sup>1</sup>, T. P. Kazubskaya<sup>2</sup>, and E. A. Braga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

<sup>2</sup> Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

\*e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Breast cancer is the most common type of cancer among women. The study of the mechanisms of metastasis, the main cause of death from breast cancer, as well as the search for new markers for early diagnosis and prognosis of breast cancer is an extremely topical issue. New perspectives in the diagnosis and treatment of breast cancer are opened by the mechanisms of gene regulation involving non-coding RNAs, in particular, long non-coding RNAs (lncRNAs). In this work, we analyzed the methylation level of seven lncRNA genes (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3*, and *PLUT*) by quantitative methyl-specific PCR on a set of 79 paired (tumor/normal) samples breast cancer. Hypermethylation of all seven lncRNA genes was revealed, and hypermethylation of *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3* and *PLUT* was detected by us in breast cancer for the first time. It was found that the level of methylation of the studied lncRNA genes correlated statistically significantly with the stage of the tumor process, the size of the tumor, and the presence of metastases in the lymph nodes. Thus, methylation of the seven studied lncRNA genes is associated with the development and progression of breast cancer, and these genes can be useful as potential markers in the diagnosis and prognosis of breast cancer.

**Keywords:** long non-coding RNA genes, DNA methylation, breast cancer

УДК 57.023

## РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЯХ *Drosophila melanogaster*

© 2024 г. П. А. Миляева<sup>a, b</sup>, И. В. Кукушкина<sup>a</sup>, А. Р. Лавренов<sup>a, c</sup>, И. В. Кузьмин<sup>a</sup>,  
А. И. Ким<sup>a, b</sup>, Л. Н. Нефедова<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>b</sup> Faculty of Biology, Longgang District, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172 China

<sup>c</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 03.08.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Регуляция активности ретротранспозонов в соматических тканях – сложный процесс, детали которого остаются неизученными. Основным механизмом подавления транспозиции за пределами гонад считается siРНК-интерференция, однако в последнее время появляется все больше сведений, подтверждающих участие системы piРНК-интерференции в контроле активности ретротранспозонов во время развития соматических тканей, в частности нервной системы. В настоящей работе на модельном объекте *Drosophila melanogaster* проведен комплексный анализ экспрессии основных генов, участвующих в piРНК-интерференции, в сочетании с изучением экспрессии отдельных ретротранспозонов и кластеров piРНК в генеративных и соматических тканях, включая нервные ткани. Показано, что повышение экспрессии ретротранспозонов при нарушении работы этой системы происходит тканеспецифично. Ведущим фактором в тканеспецифичной регуляции ретротранспозона является не его положение в геноме, а наличие в его последовательности сайтов связывания транскрипционных факторов.

**Ключевые слова:** ретротранспозоны, нанопоровое секвенирование, *Drosophila melanogaster*, фенотип flamenco

DOI: 10.31857/S0026898424010094, EDN: ODХKBV

### ВВЕДЕНИЕ

Система piРНК-интерференции – сложный многофакторный процесс, главная функция которого состоит в регуляции активности ретроэлементов (ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (ДКП) и без них). Эта система работает главным образом в клетках зародышевого пути, где исключительно важна защита от транспозиции. Наиболее детально молекулярные механизмы piРНК-интерференции изучены в соматических и генеративных тканях яичников *Drosophila melanogaster*. Белок PIWI, главный компонент системы piРНК-сайленсинга, в клетках зародышевого пути связывает piРНК, которые процессируются в околядерной структуре, называемой “нюаж”, в ходе цикла “пинг-понг”; в соматических тканях яичников PIWI связывает piРНК из комплекса Yb-тельца, которое располагается на внешней мембране митохондрий [1, 2].

Считается, что piРНК от одноцепочечных кластеров, например *flamenco*, направляются

в Yb-тельца, важными компонентами которых являются белки Armitage (Armi), Vreteno (Vret), Yellow body (Yb), Zucchini (Zuc) и Brother of Yb (BoYb). Одноцепочечные кластеры имеют собственные промоторы и состоят из дефектных копий мобильных элементов, ориентированных в едином антисмысловом направлении. piРНК от двухцепочечных кластеров, например *42AB*, образуются в результате цикла “пинг-понг” при участии белков VASA, Spindle-E (Spn-E), Krimper (Krimp), Papi, Aub и Ago3. У двухцепочечных кластеров есть неканонические сайты инициации транскрипции, последовательности мобильных элементов в них расположены как в смысловом, так и антисмысловом, по отношению к направлению транскрипции, положению [1].

Транскрипты одноцепочечных кластеров претерпевают альтернативный сплайсинг, что необходимо для правильного процессинга piРНК, транскрипты двухцепочечных кластеров защищены от альтернативного сплайсин-

га комплексом белков RDC (Rhino, Deadlock, Cutoff), однако в норме в клетке присутствуют как сплайсированные, так и несплайсированные формы транскриптов кластеров обоих типов. Считается, что сплайсированные транскрипты используются для продукции siРНК [3]. При этом мутации, повышающие частоту сплайсинга, негативно влияют на процессинг транскриптов обоих типов кластеров [4, 5]. Стоит отметить, что комплекс RDC участвует и в транскрипции двухцепочечных кластеров. На этом этапе необходимо присутствие белка Moonshiner (Moon), который связывается с белком Del и активирует транскрипцию, привлекая TRF2 (TBF-related factor 2) [6].

Основная роль белка PIWI заключается в распознавании транскриптов мобильных элементов с помощью направляющих (гидовых) рiРНК для последующей гетерохроматинизации этих участков [1]. Гетерохроматинизация происходит благодаря белкам Asterix, Panx, Str и работе комплекса SFiNX, который способствует ассоциации рибозима рiРНК-PIWI с целевым участком ДНК. Независимо от данных белков может работать белок Maelstrom (Mael) с собственным диапазоном регулируемых областей, который помимо гетерохроматинизации может способствовать генерации рiРНК из антисмысловых последовательностей [7–10] ретротранспозонов. Таким образом, инактивация различных мобильных элементов необязательно происходит с помощью одного и того же механизма.

Исследования последних лет показали, что белок PIWI контролирует не только активность мобильных элементов. Мутация в гене *piwi* может вызвать накопление фрагментов рРНК в яйчниках [11]. Более того, PIWI играет важную роль в формировании нервной ткани у нематоды и мыши [12]. Показано, что кластер *flamenco*, транскрипты которого процессируются в гидовые РНК для рiРНК-интерференции, принимает участие в формировании нервной системы дрозофилы [5].

В то же время остается неизвестным, каким образом рiРНК-интерференция работает при развитии органов, в частности центральной нервной системы (ЦНС) [12]. Считается, что в соматических клетках вне генеративных органов основное участие в регуляции мобильных элементов принимает система siРНК-интерференции, однако на дрозофиле и других модельных объектах показано, что отдельные компоненты рiРНК-интерференции, в частности кластер *flamenco*, гены *piwi*, *caz*, *aub* и *armi*, необходимы не только для инактивации ретротранспозонов, но и правильного формирования нервной ткани [5, 13]. Так, мутации в генах *aub*, *AGO3* и *armi* приводят к повышению в го-

лове дрозофилы экспрессии *blood*, *gypsy* и *HeT-A*, при этом у взрослой мухи эти гены экспрессируются в отдельных нейронах головных ганглиев [14]. Продукты этих генов и белок PIWI, принимающий участие в инактивации ретротранспозонов на уровне транскрипции, обнаруживаются в небольшом количестве в отдельных районах мозга дрозофилы, более того, PIWI экспрессируется в слюнных железах и жировом теле [15, 16]. Однако точная функция этих белков в соматических тканях остается неизвестной. Кластер *flamenco* и ген *caz* отвечают за правильное формирование моторных функций, так как при нарушении сплайсинга транскриптов *flamenco* под влиянием нокдауна гена *caz* одновременно со сверхэкспрессией *aub* снижается подвижность личинок и мух. Показано, что мутация *piwi* приводит к усиленному росту поврежденных аксонов нематоды, а нкРНК млекопитающих, которая регулирует гены, ответственные за рост аксонов, имеет транспозонное происхождение [17]. Экспрессия ретротранспозонов играет важную роль в эмбриогенезе дрозофилы и других животных, так как они способны регулировать экспрессию различных генов хозяина [18–22].

В настоящей работе проведен комплексный анализ экспрессии основных генов, участвующих в рiРНК-интерференции, в сочетании с экспрессией отдельных ретротранспозонов и кластеров рiРНК в генеративных и соматических тканях, включая нервные ткани. Для анализа были использованы линия дикого типа Canton-S, линия SS7K с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*, мутантная по локусу *flamenco*, линии *piwi*[2] и *piwi*[3], гетерозиготные по разным мутантным аллелям гена *piwi*, и их гибриды, содержащие обе мутации в компаунде. Помимо этого, проведен анализ результатов нанопорового секвенирования линий SS7K и Canton-S, чтобы оценить влияние геномного окружения и наличия сайтов связывания транскрипционных факторов на тканеспецифичную экспрессию ретротранспозонов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Линии *Drosophila melanogaster* и условия культивирования.** В работе использовали следующие линии: SS7K, выделена из исходной линии SS как одно из независимо культивируемых отведений, имеет фенотип *flamenco* (нарушение контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*) [23]; Canton-S – линия дикого типа; *piwi*[2] ( $w^{1118}$ ; P{ry11}piwi<sup>2</sup>/CyO,  $w^{+}$ ) и *piwi*[3] (P{PZ}piwi<sup>06843</sup>cn<sup>1</sup>/CyO; ry<sup>506</sup>). Все линии культивировали в термостате при температуре 25°C.

**Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** РНК выделяли

из тканей яичников, голов и корпусов (тканей, оставшихся после удаления голов и извлечения яичников) семидневных самок и ЦНС личинок с помощью реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия) после вскрытия мух или личинок в буфере PBS. ЦНС личинок извлекали по методу Hafer и Schedl, предложенном в 2006 году [24]. Перед постановкой реакции обратной транскрипции образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для обратной транскрипции использовали набор MMLV-RT Kit (“Евроген”, Россия). Обратную транскрипцию проводили со случайным праймером, так как экспрессия большинства кластеров в нашем опыте не превышает экспрессию малокопийных ретротранспозонов. ПЦР проводили в присутствии SYBR Green I (“Евроген”) в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System (“Bio-Rad Laboratories Inc.”, США). В опыте анализировали относительную экспрессию генов системы рiРНК-интерференции

*maelstrom, vreteno, nxf2, Nxf3, Hen1, moonshiner, vasa, cabeza, cutoff, armitage, zucchini, piwi, AGO3, auergine, BoYb*, кластеров рiРНК *flamenco, 42AB, 38C, 20A* ДКП-ретротранспозонов *copia, blood, gypsy, roo, Tirant*, теломерных LINE *HeT-A, TART-A, TART-B, TART-C*, нормированную на экспрессию генов *αTub84D, Rpl40* и *EloB* (табл. 1). Статистическую обработку результатов ПЦР проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Использовали по шесть образцов из каждой выборки. Праймеры для кластера *42AB* взяты из работы [4], праймеры для кластеров *38C* и *20A* – из [25], праймеры для кластера *flamenco* подобраны нами к сплайсированной форме транскрипта согласно нуклеотидной последовательности из базы данных NCBI (Gene ID: 26067356) [26]. Подобранные нами праймеры лежат в области начала транскрипции этого кластера, однако до последовательностей мобильных элементов, поэтому не отжигаются на кДНК мобильных элементов.

**Таблица 1.** Праймеры, используемые для оценки экспрессии генов, кластеров рiРНК и ретротранспозонов

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
<b>Гены</b>		
<i>αTub84D</i>	5'-GTGCATGTTGTCCAACACCAC-3'	5'-AGAАСТСТССТССТССТА-3'
<i>EloB</i>	5'-GCACAAACATACACACTCACG-3'	5'-TTTCCTACTTTCGCTTGCACC-3'
<i>Rpl40</i>	5'-CTGCGTGGTGGTATCATTG-3'	5'-CAGGTTGTTGGTGTGTCC-3'
<i>maelstrom</i>	5'-GGAATCCGATCCATCTACAG-3'	5'-TCAACAATGTTGCGGTACAG-3'
<i>vreteno</i>	5'-GCCAGTGAATCACAACAGAG-3'	5'-AAAGTGCAGAACGACCTGCG-3'
<i>nxf2</i>	5'-GAATGTGAGCACTGTCAAGC-3'	5'-CCGACAGTACGTAGGTTAAA-3'
<i>Nxf3</i>	5'-GTTCGTGCTGGACACTATGG-3'	5'-CTAGCGACTTTTGCATCTTC-3'
<i>Hen1</i>	5'-AGTCTTCAGCACACCAAATC-3'	5'-CGACTCGTATTCCTTAGGCG-3'
<i>moonshiner</i>	5'-TGGTCAACAATCGCATCTAC-3'	5'-TGGCCTGCGACCACTTTG-3'
<i>vasa</i>	5'-CGAGGAAGTTTGCTTTGAG-3'	5'-TCACTACATGGCAGCCTCTG-3'
<i>cabeza</i>	5'-CACCTACGACGACCAATG-3'	5'-GCCCTGTTCCAGTTGTTCT-3'
<i>cutoff</i>	5'-TAGTGTGCACCAGCGAAGTC-3'	5'-ACATCAATGCGGCAAATGTAC-3'
<i>armitage</i>	5'-GATGACGGTTTCGTGGAC-3'	5'-ATGAGATCGGCGAGCACA-3'
<i>zucchini</i>	5'-ATCAGAGGTGATTTGGAAGC-3'	5'-ATGGAGTATACAGCCCAGTC-3'
<i>piwi</i>	5'-CACCGAGACGATCTACGAC-3'	5'-AACTGATATCTCTACCCTTG-3'
<i>AGO3</i>	5'-AGGCGGAAGATGTTGAGTTG-3'	5'-CGCGAAGGATCAAACCTGCTT-3'
<i>aubergine</i>	5'-ACTGGACCATCTACCAGTAC-3'	5'-CAGTTCCAAAACATAGGGGC-3'
<i>BoYb</i>	5'-CCCAAGTTTCTCATGGTTTC-3'	5'-ACGAACTGCTCCGAATATG-3'
<b>Кластеры</b>		
<i>flamenco-spliced</i>	5'-CATCAGCTCAGCAGCAGTGTA-3'	5'-AGTCCAATGCTCGCTTGAAA-3'
<i>flamenco-unspliced</i>		5'-GACTTAACACTTACCGCTTGAAA-3'
<i>42AB-spliced</i>	5'-GCAGTTGCCGTCTCTCCTT-3'	5'-TGGGTCAAAGTGCAGCAGTT-3'
<i>42AB-unspliced</i>		5'-TACGGGAATATAATCGCAGCAGTT-3'

Таблица 1. Окончание

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>38C 1</i>	5'-AATGGCTAGTTCGCTACCAGACAG-3'	5'-CGGGTCTTCTCTCAAACGCAATC-3'
<i>38C 2</i>	5'-CACAAAATGGCCGCTGGAAA-3'	5'-AGCCAAACCTGTGTTGTGA-3'
<i>20A 1</i>	5'-GCCTACGCAGAGGCCTAAGT-3'	5'-CAGATGTGGTCCAGTTGTGC-3'
<i>20A 2</i>	5'-CTGCTTTGTGCTTGGAGATG-3'	5'-TCTGCACAGATTCTGAAATTGAA-3'
Ретротранспозоны		
<i>gypsy</i>	5'-CTGCTGAAAGACGGCATTATC-3'	5'-AGAAGTTTGCCTTGCCCAGAT-3'
<i>Tirant</i>	5'-AACGCTATTTCATTCTGCAAC-3'	5'-AGGGTTCTCCTAACTACGTC-3'
<i>copia</i>	5'-CTTCAGTGATGGACAACCTG-3'	5'-CAGTGTAATCTCATGGTCAT-3'
<i>roo</i>	5'-ACAGATTCCCACSTTCTTTG-3'	5'-AGCCGAGGAGTAAATGAGTA-3'
<i>blood</i>	5'-ATGCGACAACGATACAGG-3'	5'-TTTGTGTCAGCATTATCGGCG-3'
<i>HeT-A</i>	5'-TCAGGATACAGGCAAAGGAC-3'	5'-CGACTATCCACGAGCATGG-3'
<i>TART-A</i>	5'-GCAGCAGTTTCCATTTGAC-3'	5'-AAGAACACACCATCGCTTG-3'
<i>TART-B</i>	5'-GGGCAGACCAAGTTTATCC-3'	5'-TCATGTGGGAAATGTGTAGC-3'
<i>TART-C</i>	5'-ATAGGGTATGGCACGAAGG-3'	5'-AAGTAGTGGTCCGAGATTGC-3'

**Выделение ДНК и нанопоровое секвенирование.** ДНК выделяли по ранее описанной методике [27]. Концентрацию ДНК в образце оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (“PepLab”, Германия). После этого проводили подготовку библиотеки (лигирование адапторов и очистка на магнитных частицах) согласно протоколу производителя “Oxford Nanopore” (Великобритания). Затем концентрацию библиотеки оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (“PepLab”), проводили прайминг ячейки, загружали библиотеку и запускали секвенатор Oxford Nanopore MiniION. Данные секвенирования картировали на референсный геном *D. melanogaster* шестой сборки (dm6) в виртуальном ядре (WSL) Ubuntu для Windows 11 с помощью программы miniconda2 (“Anaconda Inc.”, США) с настройками для прочтений, полученных с помощью технологии секвенирования Nanopore. Результаты визуализировали с помощью программы IGV (Integrative Genomic Viewer) [28]. Для поиска уникальных (новых) инсерций исследуемых ретротранспозонов использовали программу TLDR (Transposons from long DNA reads) [29]. Библиотеку мобильных элементов создавали на основе последовательностей из BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) [30]. Результаты работы программы TLDR сортировали по длине участков новых инсерций, совпадающих с последовательностями ретротранспозонов. Также с помощью алгоритма Ugene проверяли, содержат ли найденные инсерции ретротранспозонов сайты посадки праймеров, используемых для ОТ-ПЦР [31]. Для

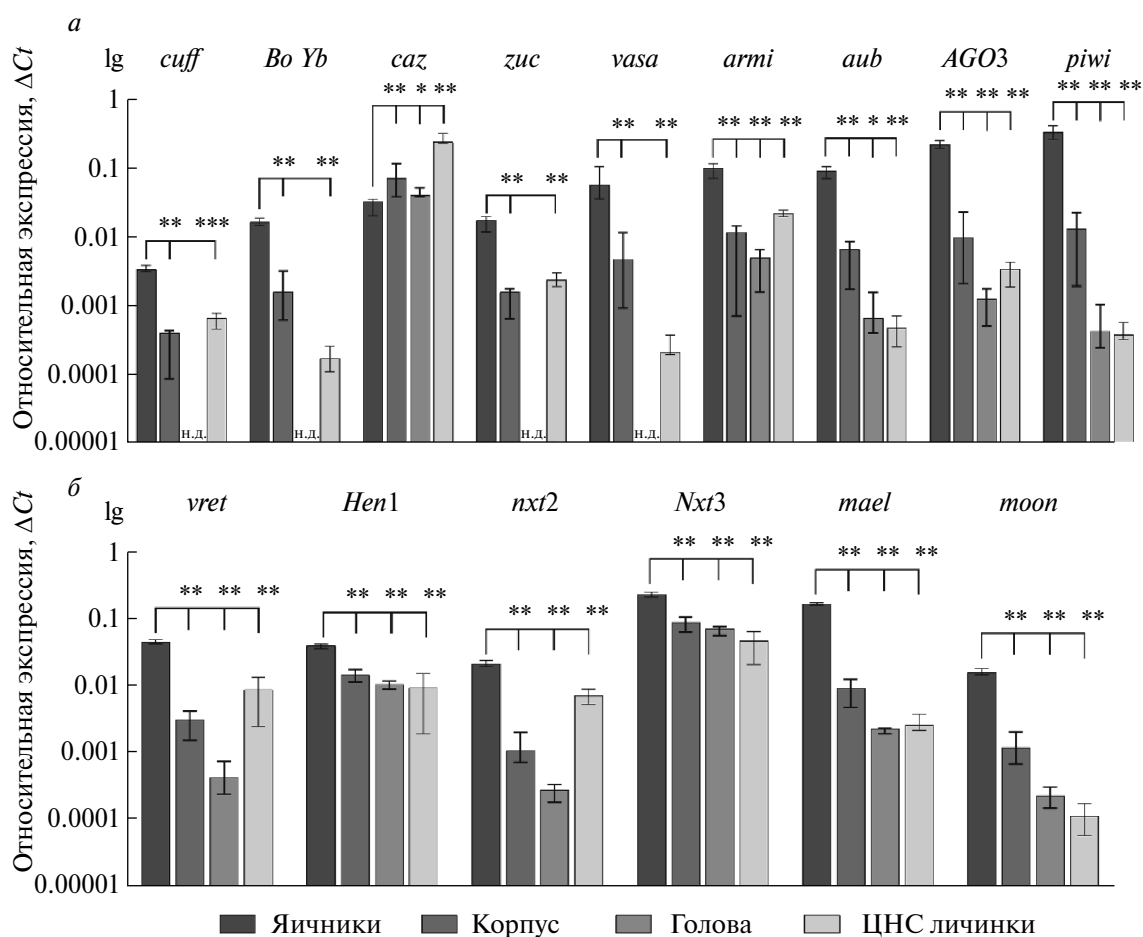
поиска неуникальных (консервативных) последовательностей ретротранспозонов использовали функцию blast в базе данных FlyBase [32], а затем проверяли наличие их инсерций в геномах используемых линий.

Поиск сайтов связывания с транскрипционными факторами в регуляторных последовательностях мобильных элементов проводили с помощью базы данных LASAGNA и модели сайтов связывания из баз данных JASPAR и TRANSFAC [33]. В анализ брали только те сайты связывания, которые были предсказаны с вероятностью  $p < 0.001$ . Функции и паттерны экспрессии транскрипционных факторов с предсказанными сайтами связывания смотрели в базе данных FlyBase [32]. Консервативность найденных сайтов связывания проверяли с помощью множественного выравнивания.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Экспрессия генов системы РНК-интерференции в генеративных и соматических тканях*

Экспрессия на уровне транскрипции 15 основных генов-участников рiРНК-интерференции в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста линии Canton-S была оценена с помощью количественной ПЦР (рис. 1). ЦНС выбрали в связи с тем, что участие кластера *flamenco* в формировании нервной системы было показано ранее [5].



**Рис. 1.** Логарифм относительной экспрессии генов-участников piRNA-интерференции в тканях яичников, корпуса и головы самок, а также в тканях ЦНС личинок третьего возраста линии Canton-S. н.д. – не детектируется, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Как и следовало ожидать, экспрессия этих генов в яичниках значительно превышает экспрессию в любой из соматических тканей. Исключением является ген *caz*, который сильнее всего экспрессируется в ЦНС личинок. Это согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями [5].

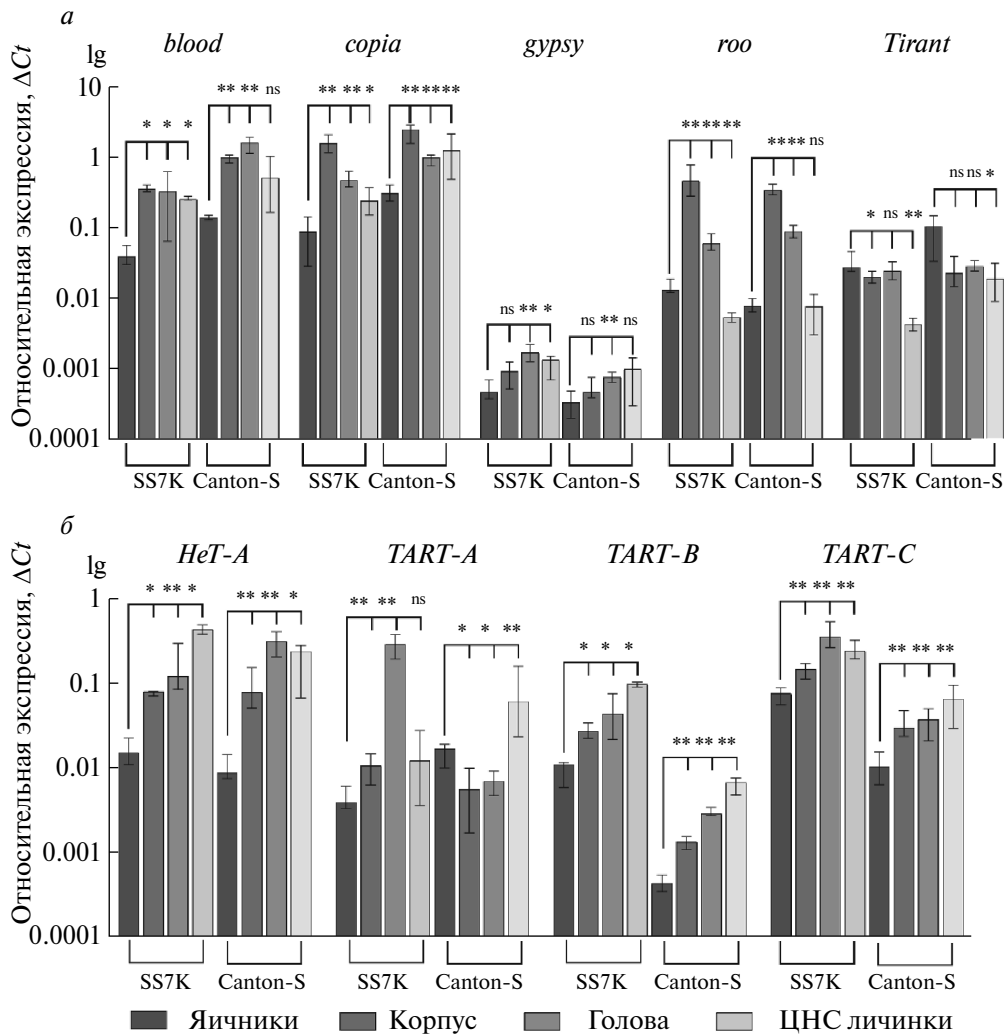
Транскрипция генов *cut*, *BoYb*, *zuc* и *vasa* обнаружена во всех тканях имаго, кроме тканей головы. При этом все исследуемые гены экспрессируются в ЦНС личинок. Экспрессия четырех ключевых генов системы piRNA-интерференции (*aub*, *AGO3*, *armi* и *piwi*) обнаружена и в головах самок, и в ЦНС личинок. Эти гены необходимы для осуществления цикла “пинг-понг” и запуска репрессии ретротранспозонов. Полученные результаты указывают на то, что в соматических тканях система piRNA-интерференции может быть активна и задействована в регуляции экспрессии отдельных ретротранспозонов.

#### Экспрессия ретротранспозонов при нарушении контроля транспозиции

Далее была измерена экспрессия на уровне транскрипции ДКП-ретротранспозонов *roo* (группа BEL), *copia* (группа Copia), *gypsy*, *Tirant*, *blood* (группа Gypsy) и LINE-элементов *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок линий Canton-S и SS7K, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста этих же линий (рис. 2).

Наиболее высокая экспрессия ДКП-ретротранспозонов *roo* и *copia* выявлена в тканях корпуса мух обеих линий, более низкая в тканях головы и самая низкая в тканях яичников, причем в яичниках имаго и ЦНС личинок *roo* экспрессировался на самом низком уровне. Таким образом, обнаружены различия в экспрессии *roo* в нервной системе взрослых мух и личинок, в то время как высокий уровень экспрессии *copia* характерен для всех соматических тканей,





**Рис. 2.** Логарифм относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* и теломерных LINE-элементов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* в тканях яичников, корпусов, головы самок и ЦНС личинок SS7K и Canton-S. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns – статистически незначимое изменение.

независимо от стадии развития. Мы также обнаружили, что наиболее высокой экспрессия *gypsy* и *blood* была в соматических тканях. *Gypsy* характеризуется наибольшей экспрессией в голове и ЦНС личинок. В отличие от всех остальных ретроэлементов, *Tirant* наиболее высоко экспрессируется в тканях яичников, показывая, что его активность регулируется одинаково как в яичниках, так и соматических тканях. LINE-элементы *TART-A*, *TART-B*, *TART-C*, *HeT-A*, как и ДКП-ретротранспозоны *gypsy* и *blood*, наиболее высоко экспрессируются в нервной ткани обеих линий.

Таким образом, транскрипция большинства ДКП-ретротранспозонов наиболее активно подавляется в тканях яичников, что коррелирует с уровнем экспрессии генов системы рiРНК-интерференции, однако в разных соматических тканях они экспрессируются по-разному, независимо от принадлежности к той

или иной группе. По-видимому, это объясняется существованием собственных механизмов регуляции в соматических тканях. Паттерны экспрессии ретроэлемента в линии SS7K с фенотипом *flamenco* не отличаются значимо от паттернов в линии дикого типа, за исключением *TART-A* и *TART-C* в нервной системе. Таким образом, наличие фенотипа *flamenco* у SS7K не критично для регуляции транскрипционной активности этих ретроэлемента.

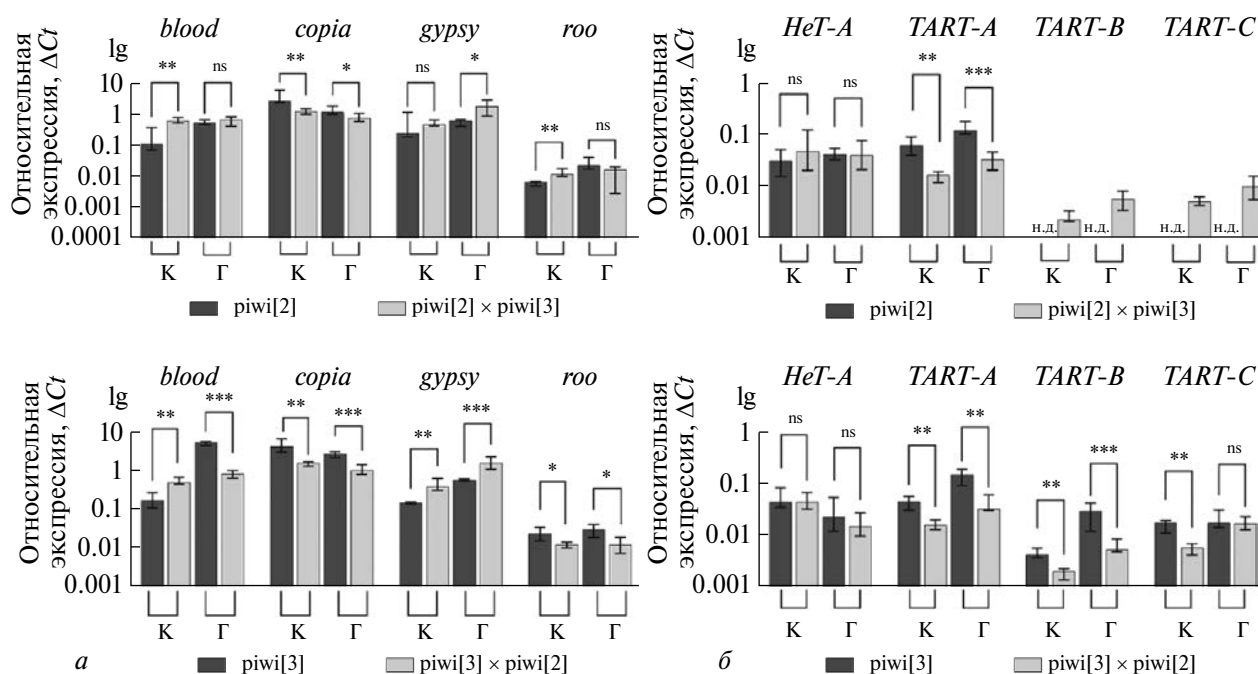
Далее проанализировали экспрессию того же набора ретроэлемента у мутантов по гену *piwi*. Используемые в работе линии, гетерозиготные по мутации в гене *piwi*, несут инсерцию Р-элемента в кодирующей части гена (в линии *piwi*[2] инсерция в 4-м экзоне, что соответствует белковому домену IMD-PIWI; в линии *piwi*[3] инсерция в 1-м экзоне, которая соответствует домену N-PAZ и структурным доменам) и балансерную хромосому 2L с мутацией *SuO*. Го-

мозиготы по мутации в линии *piwi*[2] нежизнеспособны, а в линии *piwi*[3] редко развиваются до имаго и имеют редуцированные яичники.

Были проведены реципрокные скрещивания линий *piwi*[2] и *piwi*[3], измерена экспрессия ретротранспозонов в тканях корпуса и головы у самок гибридов F<sub>1</sub>, имеющих две разные мутации в компаунде, и самок родительских линий (рис. 3). В обоих направлениях скрещиваний мы наблюдали у гибридных мутантных самок редуцированные яичники, однако редуцированные семенники были только у мутантных самцов в направлении скрещивания ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3], что согласуется с наблюдениями других исследователей и функции *PIWI* на первых стадиях дробления [34]. В связи с тем, что ткани яичников у гибридов редуцированные, мы сравнили экспрессию ретротранспозонов между родительскими линиями и гибридами только в соматических тканях.

Нами обнаружены общие тенденции изменения экспрессии нескольких исследуемых ДКП-ретротранспозонов у гибридов мух, независимо от направления скрещивания. Так, в разных тканях наблюдается одинаковая картина экспрессии ретротранспозонов *copia* и *gypsy*: экспрессия *copia* статистически значимо понижалась в тканях корпуса и головы гибридов, полученных в обоих направлениях скрещивания;

экспрессия *gypsy* наиболее сильно повышалась в голове. В отличие от *copia* и *gypsy*, ретротранспозоны *blood* и *roo* экспрессировались по-разному у гибридов, полученных в разных направлениях скрещиваний. При этом выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии этих ретротранспозонов в разных тканях родительских линий *piwi*[2] и *piwi*[3]. Так, по сравнению с линией *piwi*[2] в линии *piwi*[3] *blood* экспрессируется на более высоком уровне в тканях головы ( $p < 0.001$ ), а *roo* – в корпусах ( $p < 0.01$ ). У потомков от скрещивания ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] экспрессия *blood* была выше в тканях корпуса и такой же в тканях головы, если сравнивать с родительскими линиями (рис. 3а), а у потомков от обратного скрещивания экспрессия *blood* достоверно ниже в голове (рис. 3б). Однако в обоих направлениях скрещивания экспрессия *blood* у гибридов не различалась, поэтому эффект, наблюдаемый при сравнении самок линии *piwi*[3] с самками их потомства, вызван не репрессией *blood*, а его высокой экспрессией у самок линии *piwi*[3]. Для *roo* была характерна более высокая экспрессия в корпусе потомков от скрещивания ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3], но и в корпусе, и в голове потомков от обратного скрещивания экспрессия *roo* была ниже, чем в материнской линии, однако, мы предполагаем, такой эффект, как и в случае с *blood*, получается из-за повышенной экспрессии данного ДКП-ретротранспозона у мух линии *piwi*[3].



**Рис. 3.** Логарифм уровня относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* (а) и теломерных ретротранспозонов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* (б) в тканях корпуса и головы самок линий *piwi*[2] и *piwi*[3], а также самок F<sub>1</sub>. К – корпуса, Г – головы, н.д. – не детектируется, \* $p < 0.5$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns – статистически незначимое изменение.

Таким образом, в обоих направлениях скрещиваний мы обнаружили схожие тенденции в экспрессии двух ДКП-ретротранспозонов (*coria* и *gypsy*) в соматических тканях в зависимости от функциональности *piwi*. Это говорит о том, что экспрессия этих двух ретротранспозонов, в отличие от *blood* и *roo*, зависит от *piwi*. Причем более низкая экспрессия *coria* у гибридов не является прецедентом среди других ретротранспозонов. Например, уже описана низкая экспрессия *blood* в голове дрозофилы при мутации *AGO3* [14]. Другие исследователи наблюдали низкую экспрессию ретроэлемента *Helena* в семенниках гибридов относительно родителей при межвидовом скрещивании дрозофил [35]. Однако причин такого поведения ретротранспозонов до сих пор не найдено.

Обнаружено, что экспрессия теломерного ретротранспозона *HeT-A* изменяется вне зависимости от направления скрещивания, а транспозонов *TART-A*, *TART-B* и *TART-C* в соматических тканях гибридов ниже, чем в родительских линиях. Однако в случае последних двух ретротранспозонов такое сравнение можно провести только у потомков от скрещивания ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2], так как в линии *piwi*[2] экспрессия этих ретротранспозонов практически отсутствует. При этом мы не наблюдали более высокого уровня их экспрессии у гибридов ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] относительно ♀*piwi*[3]. Таким образом, почти полное отсутствие функции белка PIWI не приводит к ухудшению контроля данных ретротранспозонов. Тем не менее, в случае с *TART-A* мы наблюдаем статистически значимо более низкую экспрессию в соматических тканях гибридов относительно родителей в обоих направлениях скрещивания, а в случае с *TART-B* и *TART-C* только в направлении ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2] по причинам, описанным ранее (рис. 3б). Для *HeT-A* результат оказался интересным, так как показано, что экспрессия этого ретротранспозона повышается при мутации *piwi* [36, 37]. Однако данные, приведенные в этих статьях, получены на яичниках. Согласно нашим данным, компануд мутаций *piwi3* и *piwi2* не влияет на экспрессию *HeT-A* в соматических тканях. Такой эффект вполне ожидаем, с учетом того что экспрессия далеко не всех изученных ретротранспозонов повышена в тканях головы при мутациях *AGO3* и *aub* [14].

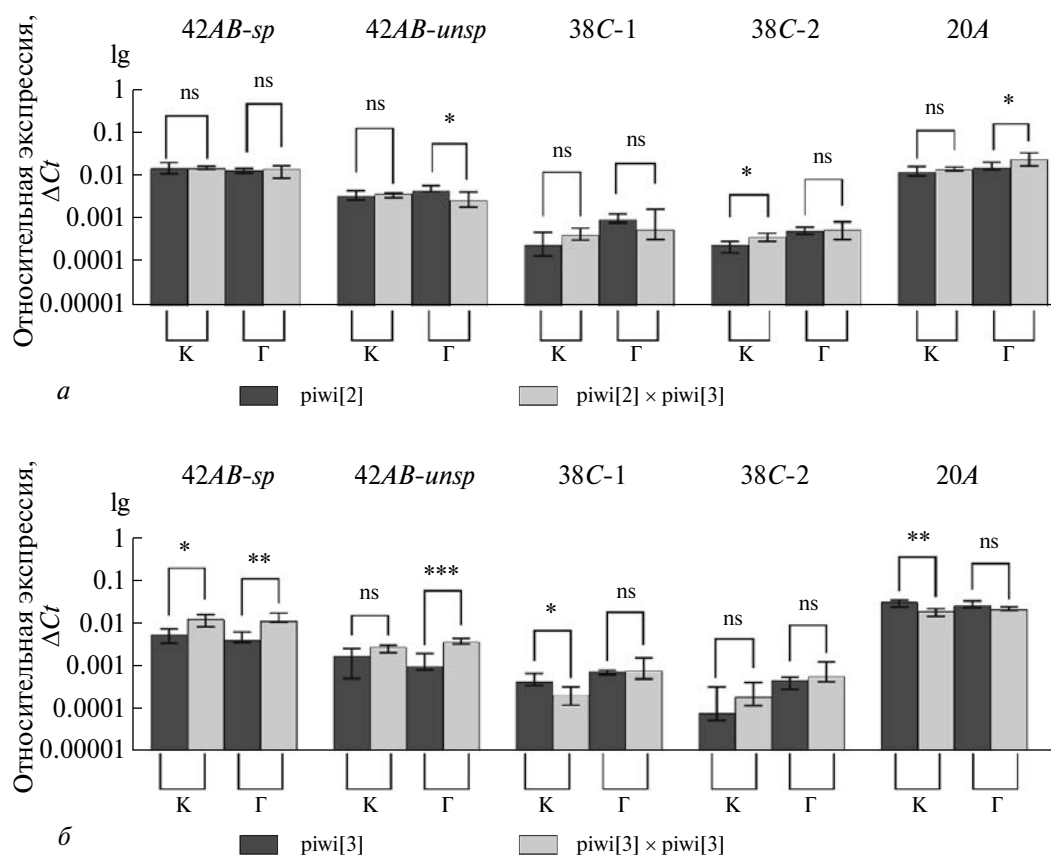
#### Экспрессия кластеров при нарушении контроля транспозиции

Кластеры рiРНК представляют собой скопления дефектных копий ретротранспозонов. Их транскрипция происходит двумя разными путями: однонаправленно либо в двух направлениях в зависимости от типа регуляции класте-

ра. Транскрипты двух разных типов кластеров процессируются каждый по отдельному механизму, однако продукты кластеров обоих типов в конечном итоге используются PIWI для поиска и замалчивания ретротранспозонов в ядре. По современным представлениям, источником транскриптов для процессинга рiРНК могут быть не только кластеры, но и отдельные последовательности ретротранспозонов [39], однако, так как их анализ технически невозможен, мы использовали кластеры рiРНК в качестве индикатора изменений транскрипции источников рiРНК.

Далее был проведен сравнительный анализ экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм кластеров *42AB* (двухцепочечный) и *flamenco* (одноцепочечный) в тканях головы и корпуса (рис. 4). В отличие от направления скрещивания ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] (рис. 4а), в направлении скрещивания ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2] (рис. 4б) мы наблюдали значимое различие в экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм кластера *42AB* у гибридов относительно материнской линии. Этот эффект, как и в случае ретроэлементов *roo* и *blood*, можно объяснить высокой экспрессией *42AB* у *piwi*[2]. Обе линии *piwi* содержат мутацию на балансерной хромосоме *SyO*, поэтому последовательность кластера *42AB* на этой хромосоме должна быть одинаковой и экспрессироваться с одинаковой силой. Следовательно, кластер *42AB* на хромосоме с мутацией в гене *piwi* в линии *piwi*[2] экспрессируется сильнее, чем на той же хромосоме у *piwi*[3]. У гибридов экспрессия *42AB* в обоих направлениях достигает уровня линии *piwi*[2], так как обе линии несут по одной хромосоме с нормальной копией этого кластера — по одной от каждого родителя.

У остальных двух кластеров изменения не так значительны: либо это более высокая экспрессия в одной из тканей у гибридов, как в случае с *20A* у гибридов ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] в голове, либо сниженная экспрессия в нескольких тканях (38C1 в корпусе гибридов ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2]). Таким образом, самые значимые изменения касаются только кластера *42AB* в одном из направлений скрещивания. Если сопоставлять этот результат с экспрессией ретротранспозонов, то мы видим, что у *piwi*[3] изначально высокая экспрессия *blood* и *roo*, а экспрессия кластера *42AB* — низкая. У гибридов в обоих направлениях экспрессия этих двух транспозонов выше, чем у *piwi*[3], кластер *42AB* экспрессируется выше. Таким образом, мы видим корреляцию в изменении экспрессии кластера и транспозонов.



**Рис. 4.** Относительный уровень экспрессии (lg) различных кластеров piRNA в тканях корпуса и головы самок линий *piwi[2]* и *piwi[3]*, а также самок гибридов этих линий. sp – сплайсированные формы, unsp – несплайсированные формы. К – корпусы, Г – головы, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns – статистически незначимое изменение.

Возможно, причина такой корреляции заключается в том, что кластер *42AB* в линии *piwi[2]* содержит копию *blood* и поэтому участвует в подавлении активности этого ретротранспозона. Описанные эффекты никак не связаны с функциональностью белка PIWI. Таким образом, несмотря на то что метки H3MeK9, которые необходимы для посадки комплекса RDC и дальнейшего преобразования копии ретротранспозона в кластер, должны появляться на участках ДНК благодаря PIWI, дальнейшее поддержание метилирования кластеров от PIWI не зависит.

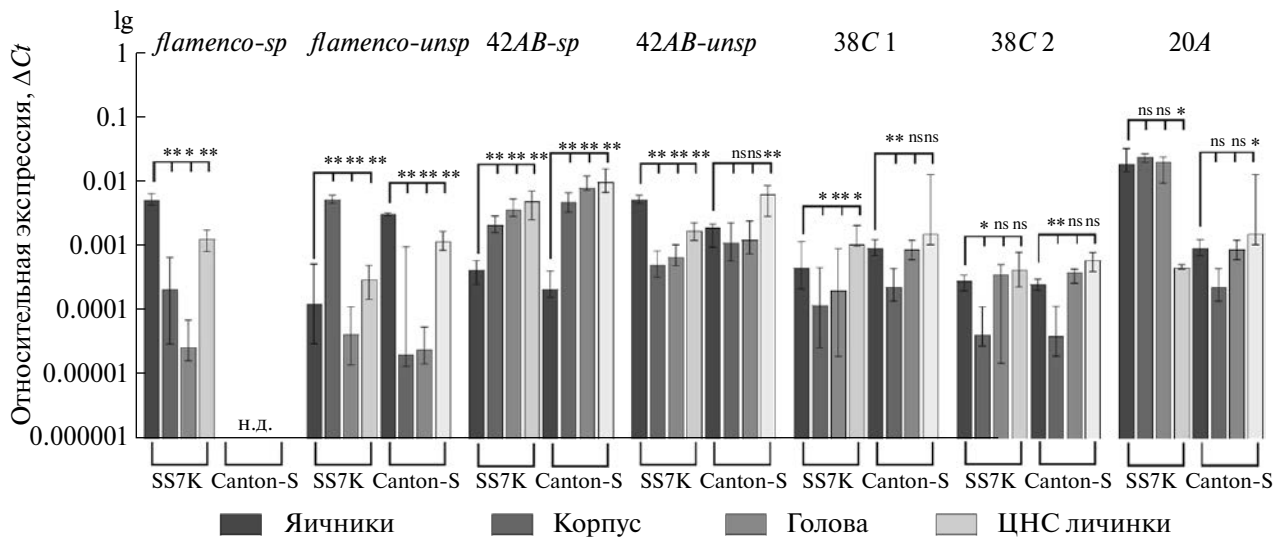
Далее был измерен уровень сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров *flamenco* и *42AB* в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок имаго линий Canton-S, SS7K, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста этих же линий (рис. 5).

Для линии Canton-S характерно присутствие только несплайсированных форм кластера *flamenco* в тканях яичников имаго и ЦНС личинок. Линия с нарушением контроля транскрипции содержит сплайсированные транскрипты в яичниках и ЦНС личинок. Несплай-

сированная форма транскрипта кластера *42AB* присутствует во всех тканях, однако его сплайсированная форма представлена в основном в соматических тканях всех линий, причем самая высокая экспрессия наблюдается в нервной ткани имаго и личинок.

Измерив экспрессию кластеров *20A* и *38C*, мы обнаружили, что экспрессия кластера *20A* значительно выше в линии с нарушением контроля *flamenco*, чем в линии дикого типа. Наибольший уровень экспрессии кластера *38C* обнаружен в яичниках и ЦНС личинок.

Трудно вывести закономерность, которая связывает разницу в экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях и экспрессию кластеров. Однако, принимая во внимание работу отдельных генов, участников piRNA-интерференции, можно предположить, что активность ретротранспозонов в этих тканях регулируются с участием отдельных компонентов системы piRNA-интерференции. Также мы не исключаем, что большая часть транскриптов кластеров может направляться в этих тканях на путь siRNA-интерференции, что показано для *42AB* и *flamenco* в голове дрозофилы [37].



**Рис. 5.** Относительный уровень экспрессии (lg) различных кластеров piRNA в тканях яичников, головы и корпуса самок SS7K и Canton-S. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; ns – статистически незначимое изменение, н.д. – не детектируется.

#### Позиции копий ретротранспозонов в геномах линий SS7K и Canton-S и наличие сайтов связывания транскрипционных факторов

С целью оценки влияния геномного окружения на тканеспецифичную транскрипцию исследуемых ДКП-ретротранспозонов мы проанализировали геномное окружение новых (уникальных для одного из геномов) инсерций ретротранспозонов в геномах линий SS7K и Canton-S, опираясь на данные нанопорового секвенирования и данные из базы FlyBase. Так как исследуемые копии являются новыми, они потенциально транскрипционно активны. Все найденные нами копии оказались в гетерозиготном состоянии, поэтому лабораторные линии по этим копиям гетерогенны.

Анализ геномного окружения показывает, что лишь некоторые копии как много-, так и малокопийных ретроэлементов, встроены в экспрессирующиеся гены: подавляющее большинство находится в генах с низкой экспрессией либо в межгенном пространстве. Так, 13 новых инсерций ретротранспозонов находятся вне генов в линии SS7K и 35 – вне генов в линии Canton-S (разница в количестве найденных новых инсерций обусловлена различием в покрытии геномов этих линий). Некоторые гены, содержащие, согласно данным FlyBase, инсерции мобильных элементов, экспрессируются на высоком уровне в соматических тканях. При этом не всегда направления транскрипции гена и ретроэлемента совпадают. Только часть найденных новых инсерций ретротранспозонов

находятся в генах, и их направление совпадает с направлением транскрипции сайта инсерции (табл. 2), поэтому механизм тканеспецифичной экспрессии отдельных ретроэлементов за счет коактивации с близлежащими генами – это, скорее, частный случай, нежели правило. Более того, на основании исследования положения новых инсерций ретроэлементов можно сделать вывод, что значительное количество ретроэлементов встраивается в гетерохроматиновые области генома. Подавляющее большинство копий локализовано либо в интронах, либо в межгенном пространстве. По всей видимости, инсерции в кодирующие части генов элиминируются отбором.

Нами также проведен анализ положений инсерций ретротранспозонов, присутствующих (по данным FlyBase) в референсном геноме. Для этого с помощью алгоритма blast был проведен поиск последовательностей исследуемых ретротранспозонов и выбрали те, которые содержали последовательности, анализируемые методом ОТ-ПЦР. Затем отобрали те последовательности, которые находятся в генах, экспрессирующихся в исследуемых тканях, и проверили наличие отобранных инсерций в нуклеотидных последовательностях линий Canton-S и SS7K (табл. 3). При этом наряду с уникальными обнаруживались и поликартированные прочтения, что связано с тем, что анализируемые последовательности не являются уникальными. Примечательно, что у линий SS7K и Canton-S практически все проанализированные инсерции были в гетерозиготном состоянии.

**Таблица 2.** Позиции новых инсерций ДКП-ретротранспозонов в геноме линий SS7K и Canton-S и паттерн экспрессии генов, содержащих, согласно базе данных FlyBase, инсерции

Ретротранспозон	Ген	Положение в гене	Коллинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
<b>SS7K</b>							
<i>blood</i>	<i>Esp</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>mtt</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>beat-llc</i>	Инtron	Нет	–	–	–	Средняя
	<i>CG2264 (magu)</i>	Инtron	Да	Выше среднего	Средняя	–	–
	<i>ds</i>	3'НТО	Нет	–	–	–	–
	<i>alpha-Est6</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
<i>copia</i>	<i>Ir42a</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>IRSp53</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>bnl</i>	Инtron	Нет	–	Средняя	Средняя	–
	<i>CG34353</i>	Инtron	Да	–	–	Средняя	Средняя
	<i>Pde9</i>	Инtron	Нет	–	–	Средняя	–
<i>roo</i>	<i>Ddr</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>CG11221 (meng-po)</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>PAPLA1</i>	5'НТО	Да	Выше среднего	Средняя	Выше среднего	Средняя
	<i>CG42818</i>	После гена	Да	–	–	–	–
	<i>CG6380</i>	Перед геном	Нет	–	–	–	–
	<i>kel</i>	Инtron	Нет	Средняя	–	–	Средняя
	<i>Gprk1</i>	Инtron	Нет	Высокая	Средняя	Выше среднего	Высокая
	<i>Fmo-2</i>	Инtron	Нет	–	Выше среднего	Выше среднего	–
	<i>CR44201</i>	После псевдогена	Да	–	–	–	–
	<i>CG9003</i>	Инtron	Да	Выше среднего	Средняя	Выше среднего	Высокая
	<i>rgn</i>	Инtron	Да	Средняя	Высокая	Высокая	Высокая
	<i>Nlg3</i>	Инtron	Да	–	–	Средняя	–
	<i>CG6040</i>	После гена	Да	–	–	–	–
	<i>CG42331</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>CR31084</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>Rya-R</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>CaMK</i>	5'НТО	Да	Выше среднего	–	–	Средняя
	<i>CG11380</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>dnc</i>	Инtron	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше среднего
	<i>CG43921 (hwt)</i>	Инtron	Нет	–	–	Средняя	Выше среднего
<i>goe</i>	Инtron	Да	Средняя	Средняя	Выше среднего	Выше среднего	
<i>CG1504</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–	
<i>Tirant</i>	<i>cactus</i>	3'НТО	Нет	Очень высокая	Выше среднего	Выше среднего	Выше среднего
	<i>Nuak</i>	Инtron	Нет	–	Средняя	–	Средняя

Таблица 2. Продолжение

Ре- тротранс- позон	Ген	Положение в гене	Колинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
<b>Canton-S</b>							
<i>blood</i>	<i>pelo</i>	Интрон	Нет	Выше среднего	Средняя	–	Средняя
	<i>CG44153</i>	Интрон	Да	–	–	–	–
	<i>dpr2</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Samuel</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Pz1</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Atg17</i>	Интрон	Нет	Высокая	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>hth</i>	Интрон	Нет	–	Средняя	Выше среднего	Выше среднего
	<i>CG6678</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
<i>coria</i>	<i>CG15431</i>	Интрон	Да	–	–	–	–
	<i>CG17684</i>	Интрон	Да	–	–	–	–
	<i>SLO2</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Pdk1</i>	Инторн	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше сред- него
	<i>dpr6</i>	Интрон	Да	Средняя	–	–	–
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Интрон	Нет	–	–	Выше среднего	–
<i>gypsy</i>	<i>CG42346</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Wdr62</i>	Интрон	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя
<i>roo</i>	<i>CG15631</i>	Экзон	Да	–	–	–	–
	<i>smog</i>	Интрон	Нет	–	–	Средняя	Выше среднего
	<i>Snoo</i>	Интрон	Да	–	–	–	Средняя
	<i>Shawl</i>	Интрон	Нет	–	–	–	Средняя
	<i>Trim9</i>	Интрон	Нет	–	–	–	Средняя
	<i>Pkn</i>	Интрон	Да	Средняя	–	Средняя	Средняя
	<i>SLO2</i>	Интрон	Нет	–	–	Средняя	Средняя
	<i>CG33144</i>	Интрон	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>CG30015</i>	Интрон	Да	–	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>sprt</i>	Интрон	yes	–	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>Oaz</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>Kank</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–
	<i>bru3</i>	Интрон	Нет	–	–	Выше среднего	Высокая
	<i>bmm</i>	Интрон	Да	Выше среднего	Выше среднего	Выше среднего	Средняя
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Интрон	Нет	–	–	Выше среднего	–
	<i>pb</i>	Интрон	Да	–	–	–	–
	<i>Ugt35b</i>	Второй экзон	Нет	–	–	Средняя	–
	<i>CG14736</i>	5'НТО	Нет	–	–	–	–
<i>CG32473</i>	Интрон	Нет	Высокая	Средняя	–	Средняя	
<i>cv-c</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–	
<i>CG18208</i>	Интрон	Нет	–	–	–	–	

Таблица 2. Окончание

Ретротранс- позон	Ген	Положение в гене	Коллинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
	<i>Dys</i>	Инtron	Нет	–	–	–	Средняя
	<i>Ire1</i>	Инtron	Нет	Средняя	–	–	Средняя
	<i>CG3822</i> ( <i>KaiRID</i> )	Инtron	Да	–	–	–	Средняя
	<i>CG13606</i>	Инtron	Нет	–	–	Средняя	Средняя
	<i>Rya-R</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>CG3777</i>	3'НТО	Да	–	–	–	Средняя
	<i>CG43867</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>CR44779</i>	внутри гена	Нет	–	–	–	Выше среднего
	<i>futsch</i>	Инtron	Да	–	–	Выше среднего	Средняя
	<i>kirre</i>	Инtron	Нет	–	–	–	–
	<i>dnc</i>	Инtron	Да	–	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>CG15894</i>	Инtron	Да	–	–	–	–
	<i>cyr</i>	5'НТО	Да	–	–	–	–
	<i>nAChR</i> <i>alpha3</i>	Инtron	Нет	–	–	–	Средняя
	<i>Ten-a</i>	Инtron	Да	–	–	Средняя	Выше среднего

Примечание. НТО – нетранслируемая область гена. – отсутствие/низкая экспрессия гена.

Таблица 3. Сравнение референсного генома и геномов SS7K и Canton-S по наличию инсерций в генах, которые, согласно базе данных FlyBase, экспрессируются в исследуемых тканях

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Коллинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>coria</i>							
<i>CG3726</i> (инtron)	Нет	Средняя				+	+
<i>toc</i> (инtron)	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>for</i> (инtron)	Нет	Высокая	Выше среднего	Средняя		+	+
<i>Ir40a</i> (инtron)	Да					+	+
<i>CadN2</i> (инtron)	Да					+	+
после <i>CG44623</i> (500 н).	Нет						
<i>mbl</i> (инtron)	Нет			Средняя	Средняя	+	+
<i>Nipped-A</i> (инtron)	Нет	Средняя			Средняя	+	+
<i>sallimus</i>	Да	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		
<i>bbg</i> (инtron)	Нет				Средняя	+	+
<i>Snap25</i> (инtron)	Нет		Средняя	Очень высокая	Средняя	+	+
<i>Lasp</i> , <i>CG43954</i> (инtron)	Нет	Очень высокая, очень высокая	Выше среднего, выше среднего	Средняя, средняя	Выше среднего, Выше среднего	+	+
<i>Eip63E</i> (инtron)	Да	Средняя			Средняя	+	+
<i>Myo81F</i>	Нет						
<i>beat-Vb</i>	Нет						



Таблица 3. Продолжение

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>CG34347</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>Gprk2</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>roo</i>							
<i>CenG1A</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>Acox3</i>	Нет						
<i>dpr2</i>	Нет						
<i>osp</i> (интрон)	Да	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>rdo</i>	Нет						
<i>CG2528</i>	Да						
<i>ds</i>	Да						
<i>Agpat2</i> (интрон)	Нет	Выше среднего				+	+
<i>Lar</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+
<i>Acox3</i> (интрон)	Нет					+	+
<i>Wnt6</i>	Да						
<i>TrissinR</i>	Нет						
<i>dpr3</i> (интрон)	Да			Выше среднего	Средняя	+	+
<i>CG13954</i>	Да						
<i>KCNQ</i>	Да						
<i>CG42663</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>sca</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	+
<i>Prosap</i> (интрон)	Да	Выше среднего		Средняя	Средняя	+	+
<i>bs</i> (интрон)	Да	Средняя				+	+
<i>pk</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	+
<i>GEFmeso</i>	Нет						
<i>MFS17</i>	Нет						
<i>luna</i>	Да						
<i>CG43867</i> (интрон)	Нет		Очень высокая	Средняя	Выше среднего	+	+
<i>CR44779</i>	Да						
<i>AstA-R1</i>	Да						
<i>rdgA</i> (интрон)	Да		Средняя	Высокая	Средняя	+	+
<i>pdgy</i> (интрон)	Нет	Выше среднего	Выше среднего	Средняя	Средняя	+	+
<i>stnA</i> (интрон)	Нет			Выше среднего	Выше среднего	+	+
<i>Scgδ</i>	Да						
<i>kirre</i>	Нет						
<i>Gas8</i>	Да						
<i>CR44833</i>	Нет						
<i>α-Man-Ia</i> (интрон)	Да	Средняя		Средняя	Средняя	+	+
<i>X11Lβ</i> (интрон)	Нет			Средняя	Выше среднего	+	+
<i>CG43759</i> (интрон)	Нет	Средняя			Средняя	+	+

Таблица 3. Продолжение

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>shakB</i>	Нет						
<i>dnc</i> (интрон)	Нет		Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>tup</i> (интрон)					Средняя	+	+
<i>Pz1</i>	Да						
<i>CG45263</i>	Нет						
<i>CG31221</i> (интрон)	Да			Высокая	Средняя	+	+
<i>SKIP</i> (интрон)	Нет	Выше среднего			Выше среднего	+	+
<i>LpR2</i> (интрон)	Да	Очень высокая	Очень высокая	Высокая	Выше среднего	+	+
<i>α4GT2</i>	Да						
<i>plum</i> (интрон)	Нет				Выше среднего	+	+
<i>heca</i> (интрон)	Да	Средняя			Очень высокая	+	+
<i>Myo81F</i>	Да						
<i>5-HT2B</i>	Нет						
<i>Dop1R1</i>	Нет						
<i>CG34355</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>Rya-R</i>	Да						
<i>CG31038</i> (интрон)	Да			Средняя		+	+
<i>proG</i> (интрон)	Нет			Средняя	Очень высокая	+	+
<i>heph</i> (интрон)	Да	Выше среднего		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>syd</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Средняя	+	+
<i>Rbp6</i> (интрон)	Нет			Высокая	Очень высокая	+	+
<i>Eip75B</i> (интрон)	Нет			Средняя	Высокая	+	+
<i>ftz-f1</i> (интрон)	Да	Выше среднего				+	+
<i>Papss</i> (интрон)	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>Svil</i> (интрон)	Да	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>CG42747</i>	Да						
<i>GluR1B</i>	Нет						
<i>bru3</i> (интрон)	Нет			Выше среднего	Выше среднего	+	+
<i>Pka-C3</i> (интрон)	Да		Выше среднего	Выше среднего		+	+
<i>Pc</i> (интрон)	Нет	Выше среднего			Средняя	+	+
<i>Con</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+
<i>CG43163</i>	Да						
<i>Obp73a</i>	Да						
<i>bab2</i> (интрон)	Нет				Выше среднего	+	+
<i>bma</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+

Таблица 3. Окончание

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<b><i>gypsy</i></b>							
<i>CG17684</i> (интрон)	Да			Средняя		+	+
<i>Pzl</i>	Да						
<i>Pzl</i>	Нет						
<i>l(3)80Fg</i> (интрон)	Да		Средняя	Высокая	Высокая	+	+
<i>lovit</i> (интрон)	Да			Выше среднего		+	+
<b><i>Tirant</i></b>							
<i>CG42534</i>	Нет						
<i>CG42238</i>	Нет						
<i>Cipc</i> (интрон)	Да			Средняя		+	-
<i>SNF4Aγ</i> (интрон)	Нет		Выше среднего			+	+
<i>Raf</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	-
<i>CG34417</i> (интрон)	Нет						
<i>CG32486</i> (интрон)	Нет		Выше среднего	Выше среднего	Средняя	+	-
<i>skd</i> (интрон)	Нет	Выше среднего		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>Shab</i> (интрон)	Нет			Средняя		+	+
<i>psq</i> (интрон)	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше среднего	+	-
<i>unc-5</i> (интрон)	Да				Средняя	+	-
<i>chn</i> (интрон)	Да	Средняя		Средняя	Выше среднего		
<i>CG11360</i> (интрон)	Нет			Средняя	Высокая	+	-
<i>raw</i> (интрон)	Да		Средняя	Средняя		+	-
<i>Fs(2)Ket</i> (интрон)	Нет	Высокая	Средняя	Средняя	Высокая	+	+
<b><i>blood</i></b>							
<i>dnt</i>	Нет						
<i>CG42329</i> (интрон)	Да						
<i>chinmo</i>	Да				Выше среднего	+	+
<i>CG44153</i> (интрон)	Да						
<i>Tsp39D</i>	Да			Средняя	Выше среднего	+	+
после <i>lncRNA:CR45347</i>	Да						
<i>Plc21C</i> (интрон)	Нет			Средняя	Средняя	+	+
<i>\DIP-λ</i>	Нет						
<i>CG30116</i> (интрон)	Нет			Средняя		+	+
после <i>CG8517</i>	Да						
<i>CG43163</i>	Да						
<i>CG14459</i>	Да						
<i>Myo81F</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>heph</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>flamenco</i>	Нет						

Как и в случае новых инсерций, мы обнаружили, что ретротранспозоны находятся в межгенном пространстве (85 инсерций исследуемых ретротранспозонов) или интронах, причем направления транскрипции гена и ретротранспозона далеко не всегда совпадают. Мы проверили присутствие в геномах SS7K и Canton-S только тех инсерций, которые находятся в генах, экспрессирующихся в исследуемых тканях, однако ни у одного из исследуемых ретротранспозонов не нашли корреляции положения инсерций с профилем их экспрессии в соматических тканях. Таким образом, экспрессия ретротранспозонов не зависит от их положения в геноме. Однако мы не исключаем, что возможны редкие случаи зависимости экспрессии ретротранспозонов от их положения, но это не является основным механизмом регуляции их активности.

*Анализ регуляторных областей уникальных инсерций ретротранспозонов*

С помощью базы данных LASAGNA (табл. 4) нами был проведен поиск сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ) в регулятор-

ных последовательностях исследуемых ДКП-ретротранспозонов (ДКП и 3'НТО). После этого мы использовали новые инсерции ретротранспозонов в линиях SS7K и Canton-S для построения выравнивания и проверки консервативности найденных сайтов связывания ТФ. Мы обнаружили, что все ТФ, которые экспрессируются в яичниках, также играют важную роль и в других тканях и участвуют в делении, дифференцировке клеток, эмбриональном развитии и ответе на стресс. Однако, как показано в предыдущих разделах, некоторые ретроэлементы наиболее активно экспрессируются в соматических тканях. Исключением стал ретротранспозон *Tirant*, который экспрессируется только в яичниках. Также нами во всех ДКП-ретроэлементах проведен поиск возможных дополнительных сайтов связывания ТФ, активных в соматических тканях. Мы обнаружили, что такие сайты имеются у всех ретроэлементов. Однако стоит принять во внимание, что консервативность найденных сайтов связывания ТФ у *gypsy* и *Tirant* не удастся проверить с должной точностью, так как эти ретротранспозоны являются малокопийными, поэтому их новых инсерций в анализируемых геномах представлено крайне мало.

**Таблица 4.** Сайты связывания транскрипционных факторов в исследуемых последовательностях ретротранспозонов

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
<b>ТФ, которые отвечают на стресс и экспрессируются во всех тканях</b>			
ДКП	<i>blood</i>	Cf2_II(MA0015.1)	ATATATGCAC ATATATATAT
		dl_1(MA0022.1)	TGGTTTATTACA
		ovo(MA0126.1)	AGAAACGGT
		HSF(M00028)	CGCAT
		HSF(M00163)	CGAAGAGATAAGAAG
		HSF(M00166)	CTACTCGAAGAGATA
	<i>copia</i>	HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00164)	AGAGTGGTATTCTCT
	<i>gypsy</i>	HSF(M00166)	CCTCGAGCAATGCAT
		Bcd(T00063)	ACCTAATCTCCA
		Lag1(MA0193.1)	CTACTGG
	<i>roo</i>	dl_1(MA0022.1)	TGGGATTTTACA
		h(MA0449.1)	GTCACCTGAG
		slbo(MA0244.1)	ATTGCTCA
		z(MA0255.1)	ATGAGTCAGT
		C/EBP(T00106)	TTTTTACAAAAACT
		HSF(M00028)	AGAAT
	<i>Tirant</i>	HSF(M00164)	CGAGTAAAGTCTTCT
		Cad(T00079)	AGCATAATGA
		Cad(T00079)	AGCATAATG
		Cad(T00079)	GGCCGAATG
		Deaf1(MA0185.1)	AGCATTTCGGCCGGAA
		h(MA0449.1)	GCCACATGCC
		slbo(MA0244.1)	ATTACACA
HSF(M00028)	CGAAT		

Таблица 4. Продолжение

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
5'НТО	<i>blood</i>	bcd(MA0212.1)	TAAGCC
	<i>copia</i>	HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00028)	AGAAT
		Zeste(M00283)	GAATTTGAGTGAAAA
	<i>roo</i>	Cf2_II(MA0015.1)	ATACACGTAC
		Cf2_II(MA0015.1)	ATATATATAT
		Cf2_II(MA0015.1)	GTGTATATGC
		Cf2_II(MA0015.1)	GTGTATATGC
		HSF(M00164)	AAACAAGAATTTTCT
		HSF(M00166)	CTTAAAGAAGAGAAG
		TII(T00789)	AGGAAGTCAAATTC
	<i>Tirant</i>	Cad(T00079)	GTCATAATTT
		dl(M00043)	CGGTATGTCCA
		HSF(M00028)	AGAAT
		CF2-II(M00012)	CTATATACA
		CF2-II(M00012)	ATATATGTG
		slbo(MA0244.1)	ATTGCACA
		slbo(MA0244.1)	ATTGCAGA
		Cad(T00079)	GTAATAAAGA
tll(MA0459.1)		TAAAGCCAAA	
tll(MA0459.1)		AGAAGTCGAC	
CF2-II(M00012)	CTATATGCA		
DII(MA0187.1)	TAATTAC		
<b>ТФ, которые экспрессируются только в соматических тканях</b>			
ДКП	<i>blood</i>	slp1(MA0458.1)	GTGTTTTCTT
		sna(MA0086.1)	CAAGTG
		vvl(MA0254.1)	TATGCA
	<i>copia</i>	br_Z1(MA0010.1)	TAAACTTGACT
	<i>gypsy</i>	brk(MA0213.1)	GTGGCGAT
		caup(MA0217.1)	TAACA
		ct(MA0218.1)	TTGAAC
	<i>roo</i>	br_Z1(MA0010.1)	GACTATTT
		onecut(MA0235.1)	CTGATTT
		tup(MA0248.1)	CTAAGGG
5'НТО	<i>blood</i>	run::Bgb(MA0242.1)	AAGCCGCAA
		Optix(MA0199.1)	TGATA
		mirr(MA0233.1)	TGACA
		caup(MA0217.1)	TGACA
	<i>copia</i>	Sd(T02030)	TTGTGAAATAGCTT
		br_Z1(MA0010.1)	СТААТАААСААТТА
		br_Z4(MA0013.1)	ТААТАААСААТ
		br_Z4(MA0013.1)	TTGTGAATTA
	<i>roo</i>	caup(MA0217.1)	ТААСА
		CG4328(MA0182.1)	CTTATGG
		Hmx(MA0192.1)	ТТААТСС
		NK7.1(MA0196.1)	СТААТАГ
		NK7.1(MA0196.1)	СТААТАГ
pan(MA0237.1)	CTTTGGTA		
slp1(MA0458.1)	CTGTTTATCCA		

Таблица 4. Окончание

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
	<i>Tirant</i>	Adf-1(M00171)	GCGCTGACGTGGAATC
		vvl(MA0254.1)	TATGCA
		CG4328(MA0182.1)	ССТАТТА
		br_Z1(MA0010.1)	СТАГТАААСААГАА
		Su(H)(M00234)	АССГТГГТАААСА
		Su(H)(MA0085.1)	ССГТГГТАААСАААСА

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведен анализ экспрессии основных генов-участников рiРНК-интерференции в генеративных и соматических тканях дрозофилы и показано, что из соматических тканей система рiРНК-интерференции наиболее активно работает в ЦНС личинок. При этом в голове взрослых мух мы наблюдали низкую экспрессию этих генов, что соответствует данными транскриптомного анализа, приведенным в базе FlyBase. Однако согласно данным анализа экспрессии этих генов в отдельных клетках головы дрозофилы, гены-участники рiРНК-интерференции экспрессируются не в цельных тканях головы, а в отдельных нейронах [14].

Считается, что в соматических тканях основную роль в подавлении активности ретротранспозонов играет siРНК-интерференция [40]. Однако мы наблюдали повышенную экспрессию отдельных ретротранспозонов в соматических тканях взрослых мутантных мух с нарушением работы генов системы рiРНК-интерференции. Следовательно, можно предполагать, что паттерны экспрессии ретротранспозонов регулируются в том числе и системой рiРНК-интерференции и закладываются во время эмбриогенеза. Если система рiРНК-интерференции нарушается, то система siРНК-интерференции, вероятно, не может компенсировать ее отсутствие.

Экспрессия теломерных ретроэлементов LINE в соматических тканях осталась неизменной у гибридов в обоих направлениях скрещивания относительно материнских линий в случае *HeT-A* и снизилась в случае элементов *TART*. Примечательно, что регуляция теломерных ретротранспозонов зависит от комплекса RDC (комплекс, осуществляющий инициацию транскрипции двухцепочечных кластеров), *aub* и *armi*. Два последних белка связаны не только с циклом “пинг-понг”, но и процессом передачи рiРНК из цикла PIWI для последующей инактивации ретротранспозонов на уровне транскрипции [41]. Однако наши результаты свидетельствуют о том, что снижение транскрипции отдельных теломерных LINE в соматических

тканях, вероятно, не связано с нарушением работы PIWI, и можно сделать предположение об активации альтернативных путей контроля экспрессии ретротранспозонов.

Также мы показали, что у мутантов по гену *piwi* наблюдается изменение уровня экспрессии ДКП-ретротранспозонов в соматических тканях. Это мы наблюдали для *gypsy* и *copia* при почти полном отсутствии функции гена *piwi* (в гибридах от скрещивания линий с мутацией в гене *piwi*). Таким образом, ген *piwi* определяет экспрессию отдельных ретроэлементов в соматических тканях. Несмотря на то что PIWI является белком, необходимым для гетерохроматинизации участков генома, содержащих последовательности мобильных элементов, и формирования кластеров рiРНК, при нарушении функции PIWI экспрессия любых типов кластеров, двухцепочечных и одноцепочечных, остается практически неизменной. На линиях Canton-S и SS7K мы показали, что экспрессия кластера *flamenco* происходит в основном в яичниках и ЦНС личинок. В соматических тканях имаго, кроме корпусов линии SS7K, экспрессия этого кластера значительно ниже, чем в яичниках, поэтому можно сделать вывод, что *flamenco* экспрессируется только в тканях с активным делением клеток. Высокая экспрессия в ЦНС также характерна и для других кластеров, что согласуется с данными о роли отдельных компонентов системы рiРНК-интерференции, полученными другими исследователями [5].

Одной из причин, по которой ретроэлементы способны поддерживать высокий уровень экспрессии в соматических тканях, может быть наличие сайтов связывания различных ТФ. При этом эффекты, связанные с положением копии ретроэлемента в геноме, оказываются минимальными и коэкспрессия с близлежащими генами — это лишь частный случай, так как копий, расположенных в генах коллинеарно направлению транскрипции этих генов, гораздо меньше, чем других вариантов положений новых копий в геноме исследуемых линий. Известно, что ДКП различных ретроэлементов способны с разной силой активировать ген-ре-

портер за счет промоторных последовательностей, и последовательность ДКП *coria* является слабой [42]. В нашей работе обнаружено, что сайтов связывания ТФ у этого ретроэлемента гораздо меньше, чем у остальных.

Система piРНК-интерференции не просто сдерживает транспозиционную активность ретроэлементов в клетках зародышевой линии, но и задает паттерн экспрессии ретроэлементов в соматических тканях, не позволяя ретроэлементам чрезмерно влиять на работу генов в эмбриогенезе и активироваться с помощью собственных сайтов связывания ТФ. Эта система является важнейшим механизмом в формировании органов и тканей, однако ее роль требует дальнейших исследований и детализации.

Работа поддержана грантом 13-1-21 “Молекулярно-генетические механизмы нестабильности генома и мутагенеза у животных и человека”. Номер ЦИТИС: 121032500085-3.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Théron E., Dennis C., Brasset E., Vaury C. (2014) Distinct features of the piRNA pathway in somatic and germ cells: from piRNA cluster transcription to piRNA processing and amplification. *Mobile DNA*. **5**, 28.
2. Qi H., Watanabe T., Ku H.-Y., Liu N., Zhong M., Lin H. (2011) The Yb Body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. *Biol. Chem.* **286**, 3789–3797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193888>
3. Dumesic P.A., Natarajan P., Chen C., Drinnenberg I.A., Schiller B.J., Thompson J., Moresco J.J., Yates J.R., Bartel D.P., Madhani H.D. (2013) Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. *Cell*. **152**, 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.046>
4. Zhang Z., Wang J., Schultz N., Zhang F., Parhad S.S., Tu S., Vreven T., Zamore P.D., Weng Z., Theurkauf W.E. (2014) The HP1 homolog rhino anchors a nuclear complex that suppresses piRNA precursor splicing. *Cell*. **157**, 1353–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.030>
5. Wakisaka K.T., Tanaka R., Hirashima T., Muraoka Y., Azuma Y., Yoshida H., Ichyanagi K., Ohno S., Itoh M., Yamaguchi M. (2019) Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. **1708**, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.028>
6. Andersen P.R., Tirian L., Vunjak M., Brennecke J. (2017) A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression. *Nature*. **549**, 54–59. <https://doi.org/10.1038/nature23482>
7. Schnabl J., Wang J., Hohmann U., Gehre M., Batki J., Andreev V.I., Purkhauer K., Fasching N., Duchek P., Novatchkova M., Mechtler K., Plaschka C., Patel D.J., Brennecke J. (2021) Molecular principles of Piwi-mediated cotranscriptional silencing through the dimeric SFiNX complex. *Genes Dev.* **35**, 392–409. <https://doi.org/10.1101/gad.347989.120>
8. Chang Y.-H., Dubnau J. (2019) The gypsy endogenous retrovirus drives non-cell-autonomous propagation in a *Drosophila* tdp-43 model of neurodegeneration. *Curr. Biol.* **29**, 3135–3152.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.07.071
9. Onishi R., Sato K., Murano K., Negishi L., Siomi H., Siomi M.C. (2020) Piwi suppresses transcription of Brahma-dependent transposons via Maelstrom in ovarian somatic cells. *Sci. Adv.* **6**(50), eaaz 7420. doi: 10.1126/sciadv.aaz7420
10. Muerdter F., Guzzardo P.M., Gillis J., Luo Y., Yu Y., Chen C., Fekete R., Hannon G.J. (2013) A genome-wide RNAi screen draws a genetic framework for transposon control and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Mol. Cell*. **50**, 736–748. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.006
11. Stolyarenko A.D. (2020) Nuclear argonaute *Piwi* gene mutation affects rRNA by inducing rRNA fragment accumulation, antisense expression, and defective processing in *Drosophila* ovaries. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1119. <https://doi.org/10.3390/ijms21031119>
12. Kim K.W. (2019) PIWI proteins and piRNAs in the nervous system. *Mol. Cells*. **42**, 12, 828–835. doi: 10.14348/molcells.2019.0241
13. Kim K.W., Tang N.H., Andrusiak M.G., Wu Z., Chisholm A.D., Jin Y. (2018) A neuronal piRNA pathway inhibits axon regeneration in *C. elegans*. *Neuron*. **97**, 511–519.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.014>
14. Perrat P.N., DasGupta S., Wang J., Theurkauf W., Weng Z., Rosbash M., Waddell S. (2013) Transposition-driven genomic heterogeneity in the *Drosophila* brain. *Science*. **340**, 91–95. <https://doi.org/10.1126/science.1231965>
15. Ross R.J., Weiner M.M., Lin H. (2014) PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. **505**, 353–359. <https://doi.org/10.1038/nature12987>
16. Zuo L., Wang Z., Tan Y., Chen X., Luo X. (2016) piRNAs and their functions in the brain. *Int. J. Hum. Genet.* **16**(1-2), 53–60. doi:10.1080/09723757.2016.11886278
17. Nampoothiri S.S., Rajanikant G.K. (2017) Decoding the ubiquitous role of microRNAs in neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* **54**, 2003–2011. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9797-2>
18. Trizzino M., Kapusta A., Brown C.D. (2018) Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion. *BMC Genomics*. **19**, 468. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4850-3>

19. Moschetti R., Palazzo A., Lorusso P., Viggiano L., Massimiliano Marsano R. (2020) “What You Need, Baby, I Got It”: transposable elements as suppliers of cis-operating sequences in *Drosophila*. *Biology* (Basel). **9**, 25. <https://doi.org/10.3390/biology9020025>
20. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э. К. (2020) Участие мобильных элементов в нейрогенезе. *Вавуловский журн. генетики и селекции*. **24**, 2, 209–218.
21. Villanueva-Sañas J.L., Horvath V., Aguilera L., González J. (2019) Diverse families of transposable elements affect the transcriptional regulation of stress-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* **47**(13), 6842–6857. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz490>
22. Senft A.D., Macfarlan T.S. (2021) Transposable elements shape the evolution of mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **22**(11), 691–711. doi: 10.1038/s41576-021-00385-1
23. Ким А.И., Беляева Е.С., Ларкина З.Г., Асланян М.М. (1989) Генетическая нестабильность и транспозиция мобильного элемента МДГ4 в мутаторной линии *Drosophila melanogaster*. *Генетика*. **25**(10), 1747–1756.
24. Hafer N., Schedl P. (2006) Dissection of larval CNS in *Drosophila melanogaster*. *J. Vis. Exp.* **1**, 85. doi: 10.3791/85
25. Hur J.K., Luo Y., Moon S., Ninova M., Marinov G.K., Chung Y.D., Aravin A.A. (2016) splicing-independent loading of TREX on nascent RNA is required for efficient expression of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*. *Genes Dev.* **30**, 840–855. <https://doi.org/10.1101/gad.276030.115>
26. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucl. Acids Res.* **50**(D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
27. Нефедова Л.Н., Урусов Ф.А., Романова Н.И., Шмелькова А.О., Ким А.И. (2012) Исследование транскрипционной и транспозиционной активности ретротранспозона *Tirant* в линиях *Drosophila melanogaster*, мутантных по локусу *flamenco*. *Генетика*. **48**(11), 1271–1271. <https://doi.org/10.1134/S1022795412110063>
28. Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**(1), 24–26. doi: 10.1038/nbt.1754
29. Ewing A.D., Smits N., Sanchez-Luque F.J., Faivre J., Brennan P.M., Richardson S.R., Cheetham S.W., Faulkner G.J. (2020) Nanopore sequencing enables comprehensive transposable element epigenomic profiling. *Mol. Cell.* **80**, 915–928.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.024>
30. Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B., Carlson J., Svirskas R., Patel S., Frise E., Wheeler D.A., Lewis S.E., Rubin G.M., Ashburner M., Celnik S.E. (2002) The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol.* **3**(12), RESEARCH0084. doi: 10.1186/gb-2002-3-12-research0084
31. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Uniprot (2012) UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* **28**, 1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
32. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H., Calvi B.R., Crosby M.A., Dos Santos G., Goodman J.L., Goutte-Gattat D., Jenkins V.K., Kaufman T., Larkin A., Matthews B.B., Millburn G., Strelets V.B.; the FlyBase Consortium. (2022) FlyBase: a guided tour of highlighted features. *Genetics.* **220**(4), iyac035. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>
33. Lee Ch., Huang Ch.-Hs. (2013) LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *BioTechniques.* **54**, 141–153. <https://doi.org/doi.10.2144/000113999>
34. Mani S.R., Megosh H., Lin H. (2014) PIWI proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis. *Development.* **385**, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.017>
35. Romero-Soriano V., Guerreiro M.P.G. (2016) Expression of the retrotransposon *helen* reveals a complex pattern of TE deregulation in *Drosophila* hybrids. *PLoS One.* **11**, e0147903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147903>
36. Wang S.H., Elgin S.C. (2011) *Drosophila* Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(52), 21164–21169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107892109>
37. Klenov M.S., Sokolova O.A., Yakushev E.Y., Stolyarenko A.D., Mikhaleva E.A., Lavrov S.A., Gvozdev V.A. (2011) Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(46), 18760–18765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106676108>
38. Gebert D., Neubert L.K., Lloyd C., Gui J., Lehmann R., Teixeira F.K. (2021) Large *Drosophila* germline piRNA clusters are evolutionarily labile and dispensable for transposon regulation. *Mol. Cell.* **81**(19), 3965–3978.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.011
39. Chung W.-J., Okamura K., Martin R., Lai E.C. (2008) Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *drosophila* transposons. *Curr. Biol.* **18**, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.006>
40. Carthew R.W., Sontheimer E.J. (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* **136**, 642–655. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035
41. Cacchione S., Cenci G., Raffa G.D. (2020) Silence at the end: how *drosophila* regulates expression and transposition of telomeric retroelements. *J. Mol. Biol.* **432**, 4305–4321. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.06.004>



42. Palazzo A., Lorusso P., Miskey C., Walisko O., Gerbino A., Marobbio C.M.T., Ivics Z., Marsano R.M. (2019) Transcriptionally promiscuous “Blurry” promoters in Tc1/mariner transposons allow transcription in distantly related genomes. *Mobile DNA*. **10**, 13. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0155-6>

## Regulation of Retrotransposons in *Drosophila melanogaster* Somatic Tissues

P. A. Milyaeva<sup>1, 2</sup>, I. V. Kukushkina<sup>1</sup>, A. R. Lavrenov<sup>1, 3</sup>, I. V. Kuzmin<sup>1</sup>, A. I. Kim<sup>1, 2</sup>,  
and L. N. Nefedova<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Longgang District, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172 China

<sup>3</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

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

Regulation of retrotransposon activity in somatic tissues is a complex mechanism that is still not studied in details. It is strongly believed that siRNA interference is main mechanism of retrotransposon activity regulation outside the gonads, but recently was demonstrated that piRNA interference participates in retrotransposon repression during somatic tissue development. In this work, using RT-PCR, we demonstrated that during ontogenesis piRNA interference determinates retrotransposon expression level on imago stage and retrotransposons demonstrate tissue-specific expression. The major factor of retrotransposon tissue-specific expression is presence of transcription factor binding sites in their regulatory regions.

**Keywords:** retrotransposons, nanopore sequencing, *Drosophila melanogaster*, flamenco phenotype

УДК 571.27:616-006.04,575.224.6

## ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ПРОЦЕССИНГА АНТИГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ (МНС) КЛАССА I В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТРИХОСТАТИНА A<sup>#</sup>

© 2024 г. А. Н. Murtadha<sup>a</sup>, N. A. Sharudin<sup>a</sup>, I. I. M. Azahar<sup>a</sup>, A. T. Che Has<sup>b</sup>, N. F. Mokhtar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute for Research in Molecular Medicine (INFORMM), Health Campus, Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, 16150 Malaysia

<sup>b</sup> Department of Neuroscience, School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, 16150 Malaysia

\*e-mail: fatmawati@usm.my

Поступила в редакцию 22.02.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Ранее показано, что ассоциированные со злокачественными опухолями эпигенетические альтерации облегчают туморогенез и индуцируют метастазирование. При изучении механизмов метастазирования обнаружили, что эпигенетика играет решающую роль в уклонении опухоли от распознавания иммунной системой. В результате эпигенетические препараты рассматривают в качестве потенциальных агентов, активирующих противоопухолевый иммунный ответ и “отменяющих” иммунологическую толерантность опухоли. Все больше данных свидетельствует о том, что aberrантная экспрессия молекул, процессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса I, и их активация – потенциальные индикаторы противоопухолевого иммунитета. В проведенном исследовании продемонстрировано, что эпигенетический препарат трихостатин А (Trichostatin A, TSA), ингибитор гистондеацетилазы, восстанавливает экспрессию генов системы презентации антигенов (antigen presentation machinery, АРМ) МНС I в клетках рака молочной железы человека (MCF-7). Обработка TSA приводила к усилению экспрессии генов МНС I, *B2M* и *PSMB9* в монослое клеток MCF-7 и МНС I, *B2M*, *PSMB9*, *PSMB8*, *TAP1* и *TAP2* в сфероидных клетках MCF-7. Интересно, что обработка TSA также увеличивала экспрессию *CD274* в этих клетках и усиливала инвазивную способность сфероида MCF-7. Это агрессивное поведение подтверждено повышенной экспрессией генов, ассоциированных с метастазами: *SCN5A* (белок pNav1.5) и *MMP1*. Таким образом, под действием TSA в клетках рака молочной железы, с одной стороны, происходит восстановление экспрессии генов АРМ МНС I, с другой – активируется экспрессия метастатических генов и *CD274*, что усиливает инвазивную способность клеток. Эти результаты свидетельствуют о необходимости глубокого изучения вопроса о возможности применения эпигенетических препаратов в терапии рака молочной железы.

**Ключевые слова:** главный комплекс гистосовместимости класса I, трихостатин А, рак молочной железы, инвазия, метастазирование, эпигенетика, PD-L1, pNav1.5, MMP1

DOI: 10.31857/S0026898424010105, EDN: NZXAHF

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reeves E., James E. (2017) Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology*. **150**, 16–24.
2. Juneja V.R., McGuire K.A., Manguso R.T., LaFleur M.W., Collins N., Haining W.N., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2017) PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **214**, 895–904.
3. Akinleye A., Rasool Z. (2019) Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 92.
4. Pedersen M.H., Hood B.L., Beck H.C., Conrads T.P., Ditzel H.J., Leth-Larsen R. (2017) Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins

<sup>#</sup>Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

- is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology*. **6**, e1305531.
5. Park H.S., Cho U., Im S.Y., Yoo C.Y., Jung J.H., Suh Y.J., Choi H.J. (2019) Loss of human leukocyte antigen class I expression is associated with poor prognosis in patients with advanced breast cancer. *J. Pathol. Transl. Med.* **53**, 75–85.
  6. Han S-H., Kim M., Chung Y.R., Woo J.W., Choi H.Y., Park S.Y. (2022) Expression of HLA class I is associated with immune cell infiltration and patient outcome in breast cancer. *Sci. Rep.* **12**, 20367.
  7. Leone P., Shin E.-C., Perosa F., Vacca A., Dammacco F., Racanelli V. (2013) MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1172–1187.
  8. Chen B., Zhu H., Yang B., Cao J. (2022) The dichotomous role of immunoproteasome in cancer: friend or foe? *Acta Pharm. Sin. B.* **13**(5), 1976–1989.
  9. Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75–112.
  10. Lee M., Song I.H., Heo S.-H., Kim Y.A., Park I.A., Bang W.S., Park H.S., Gong G., Lee H.J. (2019) Expression of immunoproteasome subunit LMP7 in breast cancer and its association with immune-related markers. *Cancer Res. Treat.* **51**, 80–89.
  11. Shashova E.E., Lyupina Y.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. (2014) Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors. *PLoS One*. **9**, e109933.
  12. Chen D., Jin C., Dong X., Wen J., Xia E., Wang Q., Wang O. (2021) Pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of PSMB8. *Sci. Rep.* **11**, 20492.
  13. Geoffroy K., Araripe S.B., Viens M., Béland D., Bourgeois-Daigneault M.-C. (2023) Increased expression of the immunoproteasome subunits PSMB8 and PSMB9 by cancer cells correlate with better outcomes for triple-negative breast cancers. *Sci. Rep.* **13**, 2129.
  14. Lehnert E., Tampé R. (2017) Structure and dynamics of antigenic peptides in complex with TAP. *Front. Immunol.* **8**, 10.
  15. Li B., Feng Y., Hou Q., Fu Y., Luo Y. (2022) Antigen peptide transporter 1 (TAP1) promotes resistance to MEK inhibitors in pancreatic cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7168.
  16. Attaran N., Coates P.J., Zborayova K., Erdogan B., Magan M., Sgaramella N., Nylander K., Gu X. (2022) Antigen peptide transporters are upregulated in squamous cell carcinoma of the oral tongue and show sex-specific associations with survival. *Oncol. Lett.* **24**, 390.
  17. Henle A.M., Nassar A., Puglisi-Knutson D., Youssef B., Knutson K.L. (2017) Downregulation of TAP1 and TAP2 in early stage breast cancer. *PLoS One*. **12**, e0187323.
  18. Kaklamanis L., Leek R., Koukourakis M., Gatter K.C., Harris A.L. (1995) Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res.* **55**, 5191–5194.
  19. Li L., Dong M., Wang X.G. (2016) The implication and significance of beta 2 microglobulin: A conservative multifunctional regulator. *Chin. Med. J.* **129**, 448–455.
  20. Wang H., Liu B., Wei J. (2021) Beta2-microglobulin(B2M) in cancer immunotherapies: biological function, resistance and remedy. *Cancer Lett.* **517**, 96–104.
  21. Gettinger S., Choi J., Hastings K., Truini A., Datar I., Sowell R., Wurtz A., Dong W., Cai G., Melnick M.A., Du V.Y., Schlessinger J., Goldberg S.B., Chiang A., Sanmamed M.F., Melero I., Agorreta J., Montuenga L.M., Lifton R., Ferrone S., Kavathas P., Rimm D.L., Kaech S.M., Schalper K., Herbst R.S., Politi K. (2017) Impaired HLA class I antigen processing and presentation as a mechanism of acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* **7**, 1420–1435.
  22. Zhang H., Cui B., Zhou Y., Wang X., Wu W., Wang Z., Dai Z., Cheng Q., Yang K. (2021) B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Sci. Rep.* **11**, 5045.
  23. Dhatchinamoorthy K., Colbert J.D., Rock K.L. (2021) Cancer immune evasion through loss of MHC class I antigen presentation. *Front. Immunol.* **12**, 469.
  24. Nepali K., Liou J.-P. (2021) Recent developments in epigenetic cancer therapeutics: clinical advancement and emerging trends. *J. Biomed. Sci.* **28**, 27.
  25. Hu C., Liu X., Zeng Y., Liu J., Wu F. (2021) DNA methyltransferase inhibitors combination therapy for the treatment of solid tumor: mechanism and clinical application. *Clin. Epigenetics.* **13**, 166.
  26. Shanmugam G., Rakshit S., Sarkar K. (2022) HDAC inhibitors: targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. *Transl. Oncol.* **16**, 101312.
  27. Choi Y.H. (2005) Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **27**, 473–479.
  28. Tavakoli-Yaraki M., Karami-Tehrani F., Salimi V., Sirati-Sabet M. (2013) Induction of apoptosis by Trichostatin A in human breast cancer cell lines: involvement of 15-Lox-1. *Tumour Biol.* **34**, 241–249.
  29. Höring E., Podlech O., Silkenstedt B., Rota I.A., Adamopoulou E., Naumann U. (2013) The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A promotes apoptosis and antitumor immunity in glioblastoma cells. *Anticancer Res.* **33**, 1351–1360.
  30. Meng J., Zhang H.H., Zhou C.X., Li C., Zhang F., Mei Q.B. (2012) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis

- in colorectal cancer cells via p53-dependent and -independent pathways. *Oncol. Rep.* **28**, 384–388.
31. Magner W.J., Kazim A.L., Stewart C., Romano M.A., Catalano G., Grande C., Keiser N., Santaniello F., Tomasi T.B. (2000) Activation of MHC Class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J. Immunol.* **165**, 7017–7024.
  32. Ritter C., Fan K., Paschen A., Reker Hardrup S., Ferrone S., Nghiem P., Ugurel S., Schrama D., Becker J.C. (2017) Epigenetic priming restores the HLA class-I antigen processing machinery expression in Merkel cell carcinoma. *Sci. Rep.* **7**, 2290.
  33. Setiadi A.F., Omilusik K., David M.D., Seipp R.P., Hartikainen J., Gopaul R., Choi K.B., Jefferies W.A. (2008) Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. *Cancer Res.* **68**, 9601–9607.
  34. Li X., Su X., Liu R., Fang J., Cao L., Feng C., Shang Q., Chen Y., Shao C., Shi Y. (2021) HDAC inhibition potentiates anti-tumor activity of macrophages and enhances anti-PD-L1-mediated tumor suppression. *Oncogene.* **40**, 1836–1850.
  35. Woods D.M., Sodr  A.L., Villagra A., Sarnaik A., Sotomayor E.M., Weber J. (2015) HDAC inhibition upregulates PD-1 ligands in melanoma and augments immunotherapy with PD-1 blockade. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1375–1385.
  36. Hassel J.C., Berking C., Schlaak M., Schlaak M., Eigentler T., Gutzmer R., Ascierto P.A., Schilling B., Hamm S., Hermann F., Reimann P.G., Schadendorf D. (2021) Results from the phase Ib of the SEN-SITIZE trial combining domatinostat with pembrolizumab in advanced melanoma patients refractory to prior checkpoint inhibitor therapy. *J. Clin. Oncol.* **39**, 9545–9545.
  37. Kamarulzaman N.S., Dewadas H.D., Leow C.Y., Yaacob N.S., Mokhtar N.F. (2017) The role of REST and HDAC2 in epigenetic dysregulation of Nav1.5 and nNav1.5 expression in breast cancer. *Cancer Cell Int.* **17**, 74.
  38. Chen W., Wong C., Vosburgh E., Levine A.J., Foran D.J., Xu E.Y. (2014) High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J. Vis. Exp.* **89**, e51639.
  39. Aulton M.E., Taylor K.M.G. (2013) *Aulton's Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*. 4<sup>th</sup> ed. London: Elsevier Health Sciences.
  40. Murtadha A.H., Azahar I.I.M., Sharudin N.A., Has A.T.C., Mokhtar N.F. (2021) Influence of nNav1.5 on MHC class I expression in breast cancer. *J. Biosci.* **46**, 70.
  41. Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101.
  42. Wan S., Pestka S., Jubin R.G., Lyu Y.L., Tsai Y.C., Liu L.F. (2012) Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One.* **7**, 32542.
  43. Garrido F., Aptsiauri N., Doorduijn E.M., Garcia-Lora A.M., Van H.T. (2016) The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 44–51.
  44. Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174–17179.
  45. Beljanski V. (2009) Trichostatin A. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Eds Enna S.J., Bylund D.B. New York: Elsevier, pp. 1–4.
  46. Vigushin D.M., Ali S., Pace P.E. (2001) Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* **7**, 971–976.
  47. Wang X., Chen S., Shen T., Lu H., Xiao D., Zhao M., Yao Y., Li X., Zhang G., Zhou X., Jiang X., Cheng Z. (2020) Trichostatin A reverses epithelial-mesenchymal transition and attenuates invasion and migration in MCF-7 breast cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **19**, 1687–1694.
  48. Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. (2014) Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 2009–(2019)
  49. Joshi R., Castro D.M.M., Pi eyro D., Alvarez-Errico D., Arribas C., Esteller M. (2020) The DNA methylation landscape of human cancer organoids available at the American type culture collection. *Epigenetics.* **15**, 1167–1177.
  50. Chen G., Liu W., Yan B. (2022) Breast cancer MCF-7 cell spheroid culture for drug discovery and development. *J. Cancer Ther.* **13**, 117–130.
  51. Pengnam S., Plianwong S., Patrojanasophon P., Radchatawedchakoon W., Yingyongnarongkul B.E., Opanasopit P., Charoensuksai P. (2021) Synergistic effect of doxorubicin and siRNA-mediated silencing of MCL-1 using cationic niosomes against 3D MCF-7 spheroids. *Pharmaceutics.* **13**, 550.
  52. Leung B.M., Leshner-Perez S.C., Matsuoka T., Moraes C., Takayama S. (2015) Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomater. Sci.* **3**, 336–344.
  53. Azahar I.I., Sharudin N.A., Din A.H.M.N., Che Has A.T., Mohd Nafi S.N., Jaafar H., Mokhtar N.F. (2022) nNav1.5 expression is associated with glutamate level in breast cancer cells. *Biol. Res.* **55**, 18.
  54. House C.D., Wang B.D., Ceniccola K., Williams R., Simaan M., Olender J., Patel V., Baptista-Hon D.T., Annunziata C.M., Gutkind J.S., Hales T.G., Lee N.H. (2015) Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity increases colon cancer transcriptional activity and invasion via persistent MAPK signaling. *Sci. Rep.* **5**, 11541.
  55. Gradek F., Lopez-Charcas O., Chadet S., Poisson L., Ouldamer L., Goupille C., Jourdan M.L., Chevalier S., Moussata D., Besson P., Roger S. (2019) Sodium channel nav1.5 controls epithelial-to-mes-

- enchymal transition and invasiveness in breast cancer cells through its regulation by the salt-inducible kinase-1. *Sci. Rep.* **9**, 18652.
56. Insua-Rodríguez J., Oskarsson T. (2016) The extracellular matrix in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 41–55.
  57. Alford A.I., Rannels D.E. (2001) Extracellular matrix fibronectin alters connexin43 expression by alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L680–L688.
  58. Pulze L., Congiu T., Brevini T.A.L., Grimaldi A., Tettamanti G., D'Antona P., Baranzini N., Acquati F., Ferraro F., de Eguileor M. (2020) MCF7 spheroid development: New insight about spatio/temporal arrangements of TNTs, amyloid fibrils, cell connections, and cellular bridges. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(15), 5400.
  59. Shabalina E.Y., Skorova E.Y., Chudakova D.A., Anikin V.B., Reshetov I.V., Mynbaev O.A., Petersen E.V. (2021) The matrix-dependent 3D spheroid model of the migration of non-small cell lung cancer: a step towards a rapid automated screening. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 610407.
  60. Boo L., Ho W.Y., Ali N.M., Yeap S.K., Ky H., Chan K.G., Yin W.F., Satharasinghe D.A., Liew W.C., Tan S.W., Ong H.K., Cheong S.K. (2016) miRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 427–445.
  61. Audoin M., Søgaard M.T., Jauffred L. (2022) Tumor spheroids accelerate persistently invading cancer cells. *Sci. Rep.* **12**, 14713.
  62. Kalaora S., Lee J.S., Barnea E., Levy R., Greenberg P., Alon M., Yagel G., Bar Eli G., Oren R., Peri A., Patkar S., Bitton L., Rosenberg S.A., Lotem M., Levin Y., Admon A., Ruppin E., Samuels Y. (2020) Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma. *Nat. Commun.* **11**, 896.
  63. Howe K.L., Achuthan P., Allen J., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M.R., Armean I.M., Azov A.G., Bennett R., Bhai J., Billis K., Boddu S., Charkhchi M., Cummins C., Da Rin Fioretto L., Davidson C., Dodiya K., El Houdaigui B., Fatima R., Gall A., Garcia Giron C., Grego T., Gujjarro-Clarke C., Haggerty L., Hemrom A., Hourlier T., Izuogu O.G., Juettemann T., Kaikala V., Kay M., Lavidas I., Le T., Lemos D., Gonzalez Martinez J., Marugán J.C., Maurel T., McMahon A.C., Mohanan S., Moore B., Muffato M., Oheh D.N., Paraschas D., Parker A., Parton A., Prosovetskaia I., Sakthivel M.P., Salam A.I.A., Schmitt B.M., Schuilenburg H., Sheppard D., Steed E., Szpak M., Szuba M., Taylor K., Thormann A., Threadgold G., Walts B., Winterbottom A., Chakiachvili M., Chaubal A., De Silva N., Flint B., Frankish A., Hunt S.E., Hsley G.R., Langridge N., Loveland J.E., Martin F.J., Mudge J.M., Morales J., Perry E., Ruffier M., Tate J., Thybert D., Trevanion S.J., Cunningham F., Yates A.D., Zerbino D.R., Flicek P. (2021) Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* **49** (D1), D884–D891.
  64. Xu W.S., Parmigiani R.B., Marks P.A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* **26**, 5541–5552.
  65. Arons E., Kunin V., Schechter C., Ehrlich R. (2001) Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J. Immunol.* **166**, 3942–3951.
  66. Tu Z., Li K., Ji Q., Huang Y., Lv S., Li J., Wu L., Huang K., Zhu X. (2023) Pan-cancer analysis: predictive role of TAP1 in cancer prognosis and response to immunotherapy. *BMC Cancer.* **23**, 133.
  67. Alimonti J., Zhang Q.J., Gabathuler R., Reid G., Chen S.S., Jefferies W.A. (2000) TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* **18**, 515–520.
  68. Wang C., Wang Z., Yao T., Zhou J., Wang Z. (2022) The immune-related role of beta-2-microglobulin in melanoma. *Front. Oncol.* **12**, 944722.
  69. Sanderson L., Taylor G.W., Aboagye E.O., Alao J.P., Latigo J.R., Coombes R.C., Vigushin D.M. (2004) Plasma pharmacokinetics and metabolism of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A after intraperitoneal administration to mice. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1132–1138.
  70. Rambaran R.N., Serpell L.C. (2008) Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion.* **2**, 112–117.
  71. Stix B., Kähne T., Sletten K., Raynes J., Roessner A., Röcken C. (2001) Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. *Am. J. Pathol.* **159**, 561–570.
  72. Natarajan K., Li H., Mariuzza R.A., Margulies D.H. (1999) MHC class I molecules, structure and function. *Rev. Immunogenet.* **1**, 32–46.
  73. Han Y., Liu D., Li L. (2020) PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 727–742.
  74. Shuai C., Yang X., Pan H., Han W. (2020) Estrogen receptor downregulates expression of PD-1/PD-L1 and infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells by inhibiting IL-17 signaling transduction in breast cancer. *Front. Oncol.* **10**, 582863.
  75. Dusenbery A.C., Maniaci J.L., Hillerson N.D., Dill E.A., Bullock T.N., Mills A.M. (2021) MHC Class I loss in triple-negative breast cancer: A potential barrier to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors. *Am. J. Surg. Pathol.* **45**, 701–707.
  76. Thompson J.C., Davis C., Hwang W.-T., Deshpande C., Jeffries S., Langer C.J., Albelda S.M. (2020) Gene signature of antigen processing and presentation machinery (APM) as highly predictive of response to checkpoint blockade in lung cancer and melanoma. *J. Clin. Oncol.* **38**, 3121–3121.
  77. Montañó-Samaniego M., Bravo-Estupiñan D.M., Méndez-Guerrero O., Alarcón-Hernández E., Ibáñez-Hernández M. (2020) Strategies for targeting gene therapy in cancer cells with tumor-specific promoters. *Front. Oncol.* **10**, 605380.

## Upregulation of MHC I Antigen Processing Machinery Gene Expression in Breast Cancer Cells by Trichostatin A

A. H. Murtadha<sup>1</sup>, N. A. Sharudin<sup>1</sup>, I. I. M. Azahar<sup>1</sup>, A. T. Che Has<sup>2</sup>, and N. F. Mokhtar<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Molecular Medicine (INFORMM), Health Campus, Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, 16150 Malaysia

<sup>2</sup> Department of Neuroscience, School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, 16150 Malaysia

\*e-mail: fatmawati@usm.my

Epigenetic alterations associated with cancer have been shown to facilitate tumorigenesis and promote metastasis. In the study of cancer metastasis, epigenetics has been revealed to play a crucial role in supporting tumour immune evasion. As a result, epigenetic drugs have been identified as potential agents to activate anti-tumour immune responses and reverse tumour immunologically tolerant states. Mounting evidence is showing aberrant expression of MHC class I antigen processing molecules in cancers and their upregulation as a potential indicator for anti-tumour immunity. In this study, we demonstrate that the epigenetic drug Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, can restore MHC I antigen presentation machinery (MHC I APM) genes in human breast cancer cells (MCF-7). Treatment with TSA resulted in the upregulation of MHC I, *B2M*, and *PSMB9* in MCF-7 monolayer cells, and MHC I, *B2M*, *PSMB9*, *PSMB8*, *TAP1*, and *TAP2* in MCF-7 spheroid cells. Interestingly, treatment with TSA also increased *CD274* expression in these cells and enhanced the invasion ability of the MCF-7 spheroid. This aggressive behaviour was confirmed by increased expression of metastatic-related genes, *SCN5A* (nNav1.5 protein) and *MMP1*. In summary, although the restoration of MHC I APM expression was achieved by TSA, the upregulation of metastatic genes and *CD274* also enhanced the invasion ability of breast cancer cells. These findings suggest the need for careful consideration when utilizing epigenetic drugs for breast cancer therapy.

**Keywords:** MHC I, Trichostatin A, breast cancer, invasion, metastasis, epigenetics, PD-L1, nNav1.5, MMP1

УДК 616-006.484:57.023,615.277.3

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SENP6 С PINK1 СПОСОБСТВУЕТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК НЕЙРОГЛИОМЫ К ТЕМОЗОЛОМИДУ ЧЕРЕЗ ИНДУКЦИЮ МИТОФАГИИ<sup>#</sup>

© 2024 г. Y. W. Wang<sup>a, §</sup>, K. G. Jia<sup>b, §</sup>, H. J. Xing<sup>c, §</sup>, Y. Pan<sup>d</sup>, C. S. Zeng<sup>c</sup>, L. Chen<sup>c</sup>, Q. J. Su<sup>c</sup>, W. T. Shen<sup>e</sup>, J. Chen<sup>f</sup>, C. Chen<sup>c, \*</sup>, Q. Cao<sup>g, \*\*</sup>, Y. Y. Wang<sup>b, \*\*\*</sup>

<sup>a</sup> School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, 611730 People's Republic of China

<sup>b</sup> Department of Thoracic Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, 610031 People's Republic of China

<sup>c</sup> Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan Province, 570100 People's Republic of China

<sup>d</sup> Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan Province, 570100 People's Republic of China

<sup>e</sup> Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510280 People's Republic of China

<sup>f</sup> Department of Neurology, Danzhou People's Hospital, Danzhou, Hainan Province, 571700 People's Republic of China

<sup>g</sup> Department of Assisted Reproductive Medicine, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, 611730 People's Republic of China

\* e-mail: 315chencong@163.com

\*\* e-mail: caoqi19920824@gmail.com

\*\*\* e-mail: Wangyouyu121@163.com

Поступила в редакцию 05.03.2023 г.

После доработки 09.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Резистентность к темозоломиду считается основной причиной рецидивов и плохого прогноза у пациентов с нейроглиомой. В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что митофагия вовлечена в развитие лекарственной устойчивости различных типов опухолей. Однако роль и молекулярные механизмы митофагии в резистентности к темозоломиду при глиоме остаются неясными. В проведенном исследовании мы оценили уровни митофагии в резистентных и чувствительных к темозоломиду клеточных линиях. Механизмы, лежащие в основе регуляции митофагии, исследовали с использованием технологии секвенирования РНК. Также проанализирована роль дифференциально экспрессируемых генов при митофагии и резистентности к темозоломиду. Обнаружено, что митофагия вовлечена в развитие резистентности клеток глиомы к темозоломиду. В этом процессе участвует в частности SUMO-специфичная пептидаза-6 (SUMO specific peptidase 6, SENP6), которая индуцирует митофагию. Взаимодействие между SENP6 и главным белком митофагии – PTEN-индуцированной киназой-1 (PINK1) – приводит к снижению степени (SUMO2)илирования PINK1, тем самым усиливая митофагию. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что, индуцируя митофагию, взаимодействие SENP6 с PINK1 способствует резистентности клеток глиобластомы к темозоломиду. Таким образом, таргетинг SENP6 или прямое регулирование митофагии можно рассматривать как потенциальные терапевтические мишени для “отмены” резистентности глиомы к темозоломиду.

**Ключевые слова:** глиобластома, темозоломид, лекарственная устойчивость, SENP6, митофагия, PINK1

**DOI:** 10.31857/S0026898424010112, **EDN:** NZGQBP

<sup>#</sup> Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

<sup>§</sup> Эти авторы внесли равный вклад.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopes M.B.S. (2017) The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol.* **134**, 521–535.
2. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996.
3. Thomas A., Tanaka M., Trepel J., Reinhold W.C., Rajapakse V.N., Pommier Y. (2017) Temozolomide in the era of precision medicine. *Cancer Res.* **77**, 823–826.
4. Zhang J., Stevens M.F., Bradshaw T.D. (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114.
5. Han B., Meng X., Wu P., Li Z., Li S., Zhang Y., Zha C., Ye Q., Jiang C., Cai J., Jiang T. (2020) ATRX/EZH2 complex epigenetically regulates FADD/PARP1 axis, contributing to TMZ resistance in glioma. *Theranostics.* **10**, 3351–3365.
6. Lu C., Wei Y., Wang X., Zhang Z., Yin J., Li W., Chen L., Lyu X., Shi Z., Yan W., You Y. (2020) DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Mol. Cancer.* **19**, 28.
7. Meng X., Zhao Y., Han B., Zha C., Zhang Y., Li Z., Wu P., Qi T., Jiang C., Liu Y., Cai J. (2020) Dual functionalized brain-targeting nanoinhibitors restrain temozolomide-resistant glioma via attenuating EGFR and MET signaling pathways. *Nat. Commun.* **11**, 594.
8. Tomar M., Kumar A., Srivastava C., Shrivastava A. (2021) Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **1876**(2), 188616.
9. Lin Z., Niu Y., Wan A., Chen D., Liang H., Chen X., Sun L., Zhan S., Chen L., Cheng C., Zhang X., Bu X., He W., Wan G. (2021) RNA m<sup>6</sup>A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy. *EMBO J.* **39**, e103181.
10. Shen W., Zhang W., Ye W., Wang H., Zhang Q., Shen J., Hong Q., Li X., Wen G., Wei T., Zhang J. (2020) SR9009 induces a REV-ERB dependent anti-small-cell lung cancer effect through inhibition of autophagy. *Theranostics.* **10**, 4466–4480.
11. Parzych K.R., Klionsky D.J. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460–473.
12. Kim K.H., Lee M.S. (2014) Autophagy – a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 322–337.
13. Onorati A.V., Dyczynski M., Ojha R., Amaravadi R.K. (2018) Targeting autophagy in cancer. *Cancer.* **124**, 3307–3318.
14. D’Arcy M.S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* **43**, 582–592.
15. Scrivo A., Bourdenx M., Pampliega O., Cuervo A.M. (2018) Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **17**, 802–815.
16. Li W., He P., Huang Y., Li Y.F., Lu J., Li M., Kurihara H., Luo Z., Meng T., Onishi M., Ma C., Jiang L., Hu Y., Gong Q., Zhu D., Xu Y., Liu R., Liu L., Yi C., Zhu Y., Ma N., Okamoto K., Xie Z., Liu J., He R.R., Feng D. (2021) Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics.* **11**, 222–256.
17. Bernardini J.P., Lazarou M., Dewson G. (2017) Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene.* **36**, 1315–1327.
18. Xie Y., Liu J., Kang R., Tang D. (2020) Mitophagy receptors in tumor biology. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 594203.
19. Chuang K.C., Chang C.R., Chang S.H., Huang S.W., Chuang S.M., Li Z.Y., Wang S.T., Kao J.K., Chen Y.J., Shieh J.J. (2020) Imiquimod-induced ROS production disrupts the balance of mitochondrial dynamics and increases mitophagy in skin cancer cells. *J. Dermatol. Sci.* **98**, 152–162.
20. Ashrafi G., Schwarz T.L. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 31–42.
21. Eiyama A., Okamoto K. (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **33**, 95–101.
22. Heo J.M., Ordureau A., Paulo J.A., Rinehart J., Harper J.W. (2015) The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol. Cell.* **60**, 7–20.
23. Bravo-San Pedro J.M., Kroemer G., Galluzzi L. (2017) Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **120**, 1812–1824.
24. Clark E.H., Vázquez de la Torre A., Hoshikawa T., Briston T. (2021) Targeting mitophagy in Parkinson’s disease. *J. Biol. Chem.* **296**, 100209.
25. Wei R., Cao J., Yao S. (2018) Matrine promotes liver cancer cell apoptosis by inhibiting mitophagy and PINK1/Parkin pathways. *Cell Stress Chaperones.* **23**, 1295–1309.
26. Liu B., Zhou J., Wang C., Chi Y., Wei Q., Fu Z., Lian C., Huang Q., Liao C., Yang Z., Zeng H., Xu N., Guo H. (2020) LncRNA SOX2OT promotes temozolomide resistance by elevating SOX2 expression via ALKBH5-mediated epigenetic regulation in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **11**, 384.
27. Wang Q., Zeng F., Sun Y., Qiu Q., Zhang J., Huang W., Huang J., Huang X., Guo L. (2018) Etk interaction with PFKFB4 modulates chemoresistance



- of small-cell lung cancer by regulating autophagy. *Clin. Cancer Res.* **24**, 950–962.
28. Zeng F., Wang Q., Wang S., Liang S., Huang W., Guo Y., Peng J., Li M., Zhu W., Guo L. (2020) Linc00173 promotes chemoresistance and progression of small cell lung cancer by sponging miR-218 to regulate Etk expression. *Oncogene.* **39**, 293–307.
  29. Zhang L., Wang L., Hu X.B., Hou M., Xiao Y., Xiang J.W., Xie J., Chen Z.G., Yang T.H., Nie Q., Fu J.L., Wang Y., Zheng S.Y., Liu Y.F., Gan Y.W., Gao Q., Bai Y.Y., Wang J.M., Qi R.L., Zou M., Ke Q., Zhu X.F., Gong L., Liu Y., Li D.W. (2022) MYPT1/PP1-mediated EZH2 dephosphorylation at S21 promotes epithelial-mesenchymal transition in fibrosis through control of multiple families of genes. *Adv. Sci. (Weinh).* **9**, e2105539.
  30. Shen W., Zhang X., Fu X., Fan J., Luan J., Cao Z., Yang P., Xu Z., Ju D. (2017) A novel and promising therapeutic approach for NSCLC: recombinant human arginase alone or combined with autophagy inhibitor. *Cell Death Dis.* **8**, e2720.
  31. Iwashita H., Torii S., Nagahora N., Ishiyama M., Shioji K., Sasamoto K., Shimizu S., Okuma K. (2017) Live cell imaging of mitochondrial autophagy with a novel fluorescent small molecule. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2546–2551.
  32. Shihan M.H., Novo S.G., Marchand S.J., Wang Y., Duncan M.K. (2021) A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochem. Biophys. Rep.* **25**, 100916.
  33. Jensen E.C. (2013) Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat. Rec. (Hoboken).* **296**(3), 378–381.
  34. Moore A.S., Holzbaaur E.L.F. (2019) Imaging the dynamics of mitophagy in live cells. *Methods Mol. Biol.* **1880**, 601–610.
  35. Montgomery M.K., Kim S.H., Dovas A., Zhao H.T., Goldberg A.R., Xu W., Yagielski A.J., Cambarelli M.K., Patel K.B., Mela A., Humala N., Thibodeaux D.N., Shaik M.A., Ma Y., Grinband J., Chow D.S., Schevon C., Canoll P., Hillman E.M.C. (2020) Glioma-induced alterations in neuronal activity and neurovascular coupling during disease progression. *Cell Rep.* **31**(2), 107500.
  36. Venkataramani V., Tanev D.I., Strahle C., Studier-Fischer A., Fankhauser L., Kessler T., Körber C., Kardorff M., Ratliff M., Xie R., Horstmann H., Messer M., Paik S.P., Knabbe J., Sahm F., Kurz F.T., Acikgöz A.A., Herrmannsdörfer F., Agarwal A., Bergles D.E., Chalmers A., Miletic H., Turcan S., Mawrin C., Hänggi D., Liu H.K., Wick W., Winkler F., Kuner T. (2019) Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature.* **573**(7775), 532–538.
  37. Venkatesh H.S., Morishita W., Geraghty A.C. (2019) Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature.* **573**(7775), 539–545.
  38. Jin J. (2019) Interplay between ubiquitylation and SUMOylation: empowered by phase separation. *J. Biol. Chem.* **294**, 15235–15236.
  39. Liu C., Zhao H., Xiao S., Han T., Chen Y., Wang T., Ma Y., Gao H., Xie Z., Du L.L., Li J., Li G., Li W. (2020) Slx5p-Slx8p promotes accurate chromosome segregation by mediating the degradation of synaptonemal complex components during meiosis. *Adv. Sci. (Weinh).* **7**, 1900739.
  40. Lazarou M., Sliter D.A., Kane L.A., Sarraf S.A., Wang C., Burman J.L., Sideris D.P., Fogel A.I., Youle R.J. (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* **524**, 309–314.
  41. Geisler S., Holmström K.M., Skujat D., Fiesel F.C., Rothfuss O.C., Kahle P.J., Springer W. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 119–131.
  42. Chang H.M., Yeh E.T.H. (2020) SUMO: from bench to bedside. *Physiol. Rev.* **100**, 1599–1619.
  43. Hsu C.Y., Yeh L.T., Fu S.H., Chien M.W., Liu Y.W., Miaw S.C., Chang D.M., Sytwu H.K. (2018) SUMO-defective c-Maf preferentially transactivates I21 to exacerbate autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.* **128**, 3779–3793.
  44. Seeler J.S., Dejean A. (2017) 1SUMO and the robustness of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **17**, 184–197.
  45. Qiu J., Sheedlo M.J., Yu K., Tan Y., Nakayasu E.S., Das C., Liu X., Luo Z.Q. (2016) Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature.* **533**, 120–124.
  46. Fu H., Liu N., Dong Q., Ma C., Yang J., Xiong J., Zhang Z., Qi X., Huang C., Zhu B. (2019) SENP6-mediated M18BP1 deSUMOylation regulates CENP-A centromeric localization. *Cell Res.* **29**, 254–257.
  47. Qian J., Luo Y., Gu X., Wang X. (2013) Inhibition of SENP6-induced radiosensitization of human hepatocellular carcinoma cells by blocking radiation-induced NF- $\kappa$ B activation. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 196–200.

## Interaction of SENP6 with PINK1 Promotes Temozolomide Resistance in Neuroglioma Cells via Inducing the Mitophagy

Y. W. Wang<sup>1, #</sup>, K. G. Jia<sup>2, #</sup>, H. J. Xing<sup>3, #</sup>, Y. Pan<sup>4</sup>, C. S. Zeng<sup>3</sup>, L. Chen<sup>3</sup>, Q. J. Su<sup>3</sup>,  
W. T. Shen<sup>5</sup>, J. Chen<sup>6</sup>, C. Chen<sup>3, \*</sup>, Q. Cao<sup>7, \*\*</sup>, and Y. Y. Wang<sup>2, \*\*\*</sup>

<sup>1</sup> School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, 611730 People's Republic of China

<sup>2</sup> Department of Thoracic Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, 610031 People's Republic of China

<sup>3</sup> Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan Province, 570100 People's Republic of China

<sup>4</sup> Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan Province, 570100 People's Republic of China

<sup>5</sup> Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510280 People's Republic of China

<sup>6</sup> Department of Neurology, Danzhou People's Hospital, Danzhou, Hainan Province, 571700 People's Republic of China

<sup>7</sup> Department of Assisted Reproductive Medicine, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, 611730 People's Republic of China

\*e-mail: 315chencong@163.com

\*\*e-mail: caoqi19920824@gmail.com

\*\*\*e-mail: Wangyouyu121@163.com

Temozolomide resistance is a major cause of recurrence and poor prognosis in neuroglioma. Recently, growing evidence has suggested that mitophagy is involved in drug resistance in various tumor types. However, the role and molecular mechanisms of mitophagy in temozolomide resistance in glioma remain unclear. In this study, mitophagy levels in temozolomide-resistant and -sensitive cell lines were evaluated. The mechanisms underlying the regulation of mitophagy were explored through RNA sequencing, and the roles of differentially expressed genes in mitophagy and temozolomide resistance were investigated. We found that mitophagy promotes temozolomide resistance in glioma. Specifically, small ubiquitin-like modifier specific protease 6 (SENP6) promoted temozolomide resistance in glioma by inducing mitophagy. Protein-protein interactions between SENP6 and the mitophagy executive protein PTEN-induced kinase 1 (PINK1) resulted in a reduction in small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2)ylation of PINK1, thereby enhancing mitophagy. Our study demonstrates that by inducing mitophagy, the interaction of SENP6 with PINK1 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. Therefore, targeting SENP6 or directly regulating mitophagy could be a potential and novel therapeutic targets for reversing temozolomide resistance in glioma.

**Keywords:** glioblastoma, temozolomide resistance, SENP6, mitophagy, PINK1

## ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ мРНК ГЕНОВ *Cxcl12*, *Tweak*, *Notch1*, *Yap* В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ФИБРОГЕНЕЗА ПЕЧЕНИ

© 2024 г. Е. И. Лебедева<sup>a</sup>, \*, А. Т. Щастный<sup>a</sup>, А. С. Бабенко<sup>b</sup>, Д. А. Зиновкин<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Витебский ордена Дружбы народов государственный медицинский университет, Витебск, 210009 Республика Беларусь

<sup>b</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, 220116 Республика Беларусь

<sup>c</sup> Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, 246050 Республика Беларусь

\*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.06.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 14.07.2023 г.

Недостаточная изученность молекулярных механизмов фиброза и цирроза печени не позволяет полностью понять все этапы развития этих патологий. Известно, что огромную роль в реализации функций генов и сигнальных путей играют взаимодействия между ними. Однако сведения о взаимосвязи генов и сигнальных путей недостаточны и часто противоречивы. В настоящей работе впервые детально изучена экспрессия мРНК генов *Notch1*, *Notch2*, *Yap1*, *Tweak* (*Tnfrsf12*), *Fn14* (*Tnfrsf12a*), *Ang*, *Vegfa*, *Cxcl12* (*Sdf*), *Nos2* и *Mmp-9* на разных стадиях индуцированного тиаоацетамидом фиброза печени крыс Wistar. С помощью факторного анализа получены три фактора, которые объединили высоко коррелирующие гены-мишени между собой. Первый фактор включает четыре гена: *Cxcl12* ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ), *Tweak* ( $r = 0.841$ ,  $p < 0.05$ ), *Notch1* ( $r = 0.848$ ,  $p < 0.05$ ), *Yap1* ( $r = 0.921$ ,  $p < 0.05$ ). Второй фактор описывает корреляции между генами *Mmp-9* ( $r = 0.791$ ,  $p < 0.05$ ) и *Notch2* ( $r = 0.836$ ,  $p < 0.05$ ). В третий фактор вошли гены *Ang* ( $r = 0.748$ ,  $p < 0.05$ ) и *Vegfa* ( $r = 0.679$ ,  $p < 0.05$ ). Гены *Nos2* и *Fn14* не вошли ни в один из факторов. Можно предположить, что продукты выбранных генов, классифицированных на основании уровней экспрессии их мРНК, взаимосвязаны в процессах фиброзных изменений печени крыс токсической этиологии. Полученные результаты представляют фундаментальный интерес для изучения патогенетических механизмов развития фиброза и цирроза печени.

**Ключевые слова:** фиброз печени, цирроз печени, молекулярные механизмы, экспрессия мРНК, факторный анализ, крысы

**DOI:** 10.31857/S0026898424010126, **EDN:** NXGUNP

### ВВЕДЕНИЕ

В развитии хронических заболеваний печени различной этиологии принимают участие сложные сети молекулярных каскадов как сигнальных путей (*Notch*, *Hedgehog*, *WNT/β-катенин*, *TWEAK/Fn14*, *Nippo* и др.), так и отдельных генов [1, 2].

Во время эмбрионального развития организма и физиологически нормально протекающего постнатального периода сигнальный путь *Notch* принимает участие в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, апоптозе, ангиогенезе и других процессах [3–6]. Путь *Notch* связан с развитием ряда заболеваний человека, а гены *Notch* вовлечены в процессы активации и трансдифференцировки клеток в миофибробластный фенотип при фиброзе легких, почек, сердца и печени [3, 4, 6, 7]. В эксперименталь-

ных работах на животных показано, что экспрессия генов сигнального пути *Notch* коррелирует с экспрессией генов других сигнальных путей, таких как *Nippo*, *Hedgehog*, *Wnt/β-катенин*, *TGFβ* [8, 9]. Предполагается, что ген *Yap1* (входит в сигнальный путь *Nippo*) является *Notch*-зависимым геном, он запускает активацию клеток, накапливающих жиры (липоциты, перисинусоидные клетки, клетки Ито, перициты, stellatные клетки) [10–12]. Однако данный механизм и взаимодействие *Yap1* с другими генами до конца не исследованы [13, 14].

Гены сигнального пути *TWEAK/Fn14* способны индуцировать поляризацию макрофагов, секрецию профибротических медиаторов, деление фибробластов и эпителиальных клеток желчных протоков и проточков, ангиогенез и прочие процессы в печени [15–17]. Данные о связи генов *Notch* и сигнальных путей *TWEAK/*

*Fn14* при фиброзе и циррозе печени практически отсутствуют.

Патологический ангиогенез и капилляризация синусоидов связаны с фиброгенезом и могут выступать в качестве его инициаторов. У животных с патологиями печени наблюдается аномальная экспрессия различных проангиогенных факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиопоэтин (ANG). Противоречивые результаты доклинических исследований свидетельствуют о сложностях в терапии фиброза с помощью сосудистой молекулярно-таргетной терапии и необходимости дальнейших исследований в этом направлении [18–20].

Хемокин CXCL12 связывается с рецептором (CXCR4) и активирует ряд сигнальных путей, которые отвечают за пролиферацию, миграцию клеток и их адгезию [21]. Показано, что одной из функций CXCL12 в опухолях человека и животных является стимуляция миграции клеток. К сожалению, к настоящему времени не удалось детально изучить функционирование CXCL12 [22]. Роли хемокина в инициации и развитии фиброза различных органов посвящено незначительное количество работ. Считается, что CXCL12 можно рассматривать как терапевтическую мишень при данном патологическом процессе, поскольку, по аналогии с опухолями, CXCL12 способен стимулировать миграцию ряда клеток при фиброзе, способствуя его инициации и прогрессированию [23, 24].

Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что ген *Nos2* играет определенную роль в фиброгенезе печени. Молекулярный механизм, с помощью которого *Nos2* способствует прогрессированию фиброза, пока не до конца. Известно, что индукция экспрессии *Nos2*, активация фермента и последующая продукция оксида азота представляют собой сложный многостадийный процесс [25–27].

Высокие уровни матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) связывают со стимуляцией фиброза и ремоделированием внеклеточного матрикса. Несмотря на значительное количество публикаций, представленных в поисковой системе PubMed, связь между ростом мРНК *Mmp-9* и прогрессированием фиброза печени изучена не до конца [28, 29].

В настоящей работе в поисковых системах по биомедицинским исследованиям был проведен поиск генов, связанных с фиброгенезом печени. Однако в проанализированных нами публикациях практически отсутствовали данные о связи между уровнями экспрессии выбранных нами генов *Notch1*, *Notch2*, *Yap1*, *Tweak* (*Tnfsf12*),

*Fn14* (*Tnfrsf12a*), *Ang*, *Vegfa*, *Cxcl12* (*Sdf*), *Nos2* и *Mmp-9*. Кроме того, на существующих экспериментальных моделях изучают либо конкретные, далеко отстоящие друг от друга ключевые позиции (норма, фиброз и цирроз), либо фиброгенез, но не на всем протяжении времени. Эти ограничения могут скрывать важные детали и ограничивают возможность соответствующих выводов. По-видимому, выбранные нами гены-мишени связаны с процессами, отвечающими за инициацию и развитие фиброза печени у человека и животных, что показано в ряде исследований [8, 9, 11, 15, 17, 23, 24, 28, 29].

Цель настоящего исследования состояла в определении уровней экспрессии мРНК генов *Notch1*, *Notch2*, *Yap1*, *Tweak* (*Tnfsf12*), *Fn14* (*Tnfrsf12a*), *Ang*, *Vegfa*, *Cxcl12* (*Sdf*), *Nos2* и *Mmp-9* на разных стадиях тиацетамид-индуцированного фиброза печени крыс Wistar и в анализе их взаимосвязи с помощью факторного анализа.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В рамках настоящей работы при описании генов применяли названия, принятые в правилах и рекомендациях по номенклатуре генов [30].

**Экспериментальная модель.** Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида (ТАА; “Acros Organics”, Бельгия), который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 17 нед. Животных разделили на восемь групп (12 особей в каждой) в зависимости от длительности воздействия ТАА: 3 нед. (группа 1), 5 нед. (2), 7 нед. (3), 9 нед. (4), 11 нед. (5), 13 нед. (6), 15 нед. (7), 17 нед. (8). Крысы контрольной группы ( $n = 12$ ) получали воду без ТАА в аналогичном объеме.

**Гистологическое и морфометрическое исследование.** После декапитации под кратковременным эфирным наркозом с применением гильотины из большой левой доли печени крыс забирали образцы диаметром 5–10 мм, которые помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина (“Биовитрум”, Россия) на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем обрабатывали фиксированный материал с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани STP-120 (“Thermo Fisher Scientific”, США) и станции для заливки ткани парафином EC350 (“Thermo Fisher Scientific”). От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окрашивания, с помощью микротомы HM340E (“MICROM, Laborgerate GmbH”, Германия) готовили в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для по-

лучения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по Маллори с помощью автомата для окраски HMS70 (“Thermo Fisher Scientific”).

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard на базе микроскопа Olympus BX51 (Япония). Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы K.G. Ishak [31].

**Оценка уровня мРНК Notch1, Notch2, Yap1, Tweak, Fn14, Ang, Vegfa, Cxcl12, Nos2 и Mmp-9.** Фрагменты печени диаметром не более 5 мм помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для хранения до начала процедуры выделения суммарной РНК. Общую фракцию РНК выделяли согласно инструкции производителя набора АртРНК MiniSpin (“АртБиоТех”, Беларусь). Качественные характеристики образцов контролировали с помощью электрофореза в ага-

розном геле (выборочно) в неденатурирующих условиях (однократный Трис-ацетатный буфер, 2%-ный агарозный гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли спектрофотометрически (длина волны – 260 нм, спектрофотометр Specord 250 (“Analytic Jena”, Германия)). Выборочно снимали спектр поглощения при 220–340 нм.

кДНК синтезировали с использованием олиго-(dT)-праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (“АртБиоТех”, Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. В каждой реакции использовали 200 нг общей фракции РНК. Олигонуклеотидные праймеры и зонды для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) выбирали с помощью онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Перечень выбранных молекулярных мишеней, референсный ген и последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в табл. 1 и табл. 2.

**Таблица 1.** Характеристика генов-мишеней и референсного гена, использованных в работе

Ген	Статус	Идентификатор гена в базе NCBI Gene ID	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
<i>Notch1</i>	Мишень	25496	NM_001105721.1	Рецептор Notch типа 1
<i>Notch2</i>	Мишень	29492	NM_024358.2	Рецептор Notch типа 2
<i>Yap1</i>	Мишень	363014	NM_001034002.2	Yes-связанный белок типа 1
<i>Tweak</i>	Мишень	360548	NM_001001513.2	Член суперсемейства фактора некроза опухоли 12
<i>Fn14</i>	Мишень	302965	NM_181086.3	Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A,
<i>Ang</i>	Мишень	305843	NM_001006992.1	Ангиогенин
<i>Vegfa</i>	Мишень	83785	NM_031836.3	Фактор роста эндотелия сосудов А
<i>Nos2</i>	Мишень	24599	NM_012611.3	Синтаза оксида азота 2
<i>Cxcl12</i>	Мишень	24772	NM_001033883.1	Хемокин подсемейства СХС
<i>Mmp-9</i>	Мишень	81687	NM_031055.2	Матриксная металлопротеиназа 9
<i>Hes1*</i>	Кандидат в референсные гены	29577	NM_024360.4	Фактор транскрипции 1 семейства Hes факторов с доменом bHLH

\* Ген *Hes1*, первоначально рассматриваемый как ген-мишень, использовали в качестве референсного, поскольку в предварительных экспериментах этот ген экспрессировался на стабильно высоком уровне [32].

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности специфических праймеров и флуоресцентно меченных зондов генов-мишеней и референсного гена

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Модификация 5'/3'
<i>Notch1</i> прямой	GTGTCCCAAAGGCTTCAGC	
<i>Notch1</i> обратный	CGTTCTTGCATGGTGTGCT	
<i>Notch1</i> зонд	GGGCACCTGTGCCAGTATGA	FAM/BHQ1
<i>Notch2</i> прямой	CCCTGGTTTCACAGGACCA	
<i>Notch2</i> обратный	TTCAGGCAGGGAGTACTGGA	
<i>Notch2</i> зонд	GTGCCAGATCGACATTGACGAC	FAM/BHQ1
<i>Yap1</i> прямой	CTGCCTCAGGGCCTCTT	
<i>Yap1</i> обратный	TGTGGTCTTGTCTTATGGTTTATG	
<i>Yap1</i> зонд	GGATGGGAGCAAGCCATGAC	FAM/BHQ1
<i>Tweak</i> прямой	CCCATTATGAGGTTTCATCCAC	
<i>Tweak</i> обратный	TCTCTTCCCAGCCACTCACT	
<i>Tweak</i> зонд	GACAGGATGGAGCACAGGCA	FAM/BHQ1
<i>Fn14</i> прямой	GGATGCGCAGCAGCAC	
<i>Fn14</i> обратный	CAAAACCAGGGCCAGACTAA	
<i>Fn14</i> зонд	CCTGCCACTTCAGGATGCT	FAM/BHQ1
<i>Ang</i> прямой	TGCGAAAGTATGATGAGGAGAA	
<i>Ang</i> обратный	TGTTGCCATGGATAAAGGTG	
<i>Ang</i> зонд	ACCTCGCCCTGCAAAGAGGT	FAM/BHQ1
<i>Vegfa</i> прямой	GCAGATCATGCGGATCAAA	
<i>Vegfa</i> обратный	ATGCTGCAGGAAGCTCATCT	
<i>Vegfa</i> зонд	CCTCACCAAAGCCAGCACAT	FAM/BHQ1
<i>Nos2</i> прямой	TCACCCAGTTGTGCATCG	
<i>Nos2</i> обратный	AGGACCAGAGGCAGCACAT	
<i>Nos2</i> зонд	GGCTGGAAGCCCCGCTAT	FAM/BHQ1
<i>Cxcl12</i> прямой	CAGATTGTTGCAAGGCTGAA	
<i>Cxcl12</i> обратный	TCCACTTTAATTTTCGGGTCAA	
<i>Cxcl12</i> зонд	AAGCAACAACAGACAAGTGTGCA	FAM/BHQ1
<i>Mtp-9</i> прямой	CTACTCGAGCCGACGTCAC	
<i>Mtp-9</i> обратный	AGAGTACTGCTTGCCAGGA	
<i>Mtp-9</i> зонд	GATGTGCGTCTTCCCCTTCG	FAM/BHQ1
<i>Hes1</i> прямой	GAAAGATAGCTCCCGGCATT	
<i>Hes1</i> обратный	CGGAGGTGCTTCACTGTCAT	
<i>Hes1</i> зонд	CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA	FAM/BHQ1

ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов производства компании “Праймтех” (Беларусь). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты: 2 мМ хлорида магния, 0.1 мМ смеси dNTP, 500 нМ олигонуклеотида, включая зонд для ПЦР-РВ, 1.25 ед. термостабильной Taq-ДНК-полимеразы в соответствующем буферном растворе. Режим термоциклирования: 95°C 2 мин, затем 40 циклов 95°C 5 с и 60°C 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали прибор CFX96touch (“BioRad”, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК. ПЦР-РВ каждого образца биологического материала проводили в трех повторах. В каждой экспериментальной и контрольной группах все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей статистической значимости и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Эффективность реакций, а также абсолютное число копий соответствующих мРНК оценивали методом стандартной кривой. Относительный уровень экспрессии мРНК определяли с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Эффективность реакций варьировала менее чем на 5% и составила 94–97%.

**Статистический анализ.** Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (“StatSoft Inc.”, США), IBM SPSS Statistics 23.0 (“An IBM Company”, 28.0.1, США), Microsoft Office Excel (“Microsoft Corp.”, США).

В выборках по каждой неделе эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Получали описательные статистики и описывали количественные данные в виде средних и соответствующих доверительных интервалов (М (95% ДИ: j–q)), медианы и значения 15–85 процентилей (Me (15%; 85%)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков (уровень экспрессии мРНК генов) в группах с нормальным частотным распределением данных судили по *t*-критерию Стьюдента; в случае отличия от нормального частотного распределения использовали U-критерий Манна–Уитни. Взаимосвязи между исследуемыми переменными изучали с применением факторного анализа – многомерного метода, который позволяет получить факторы из коррелирующих переменных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

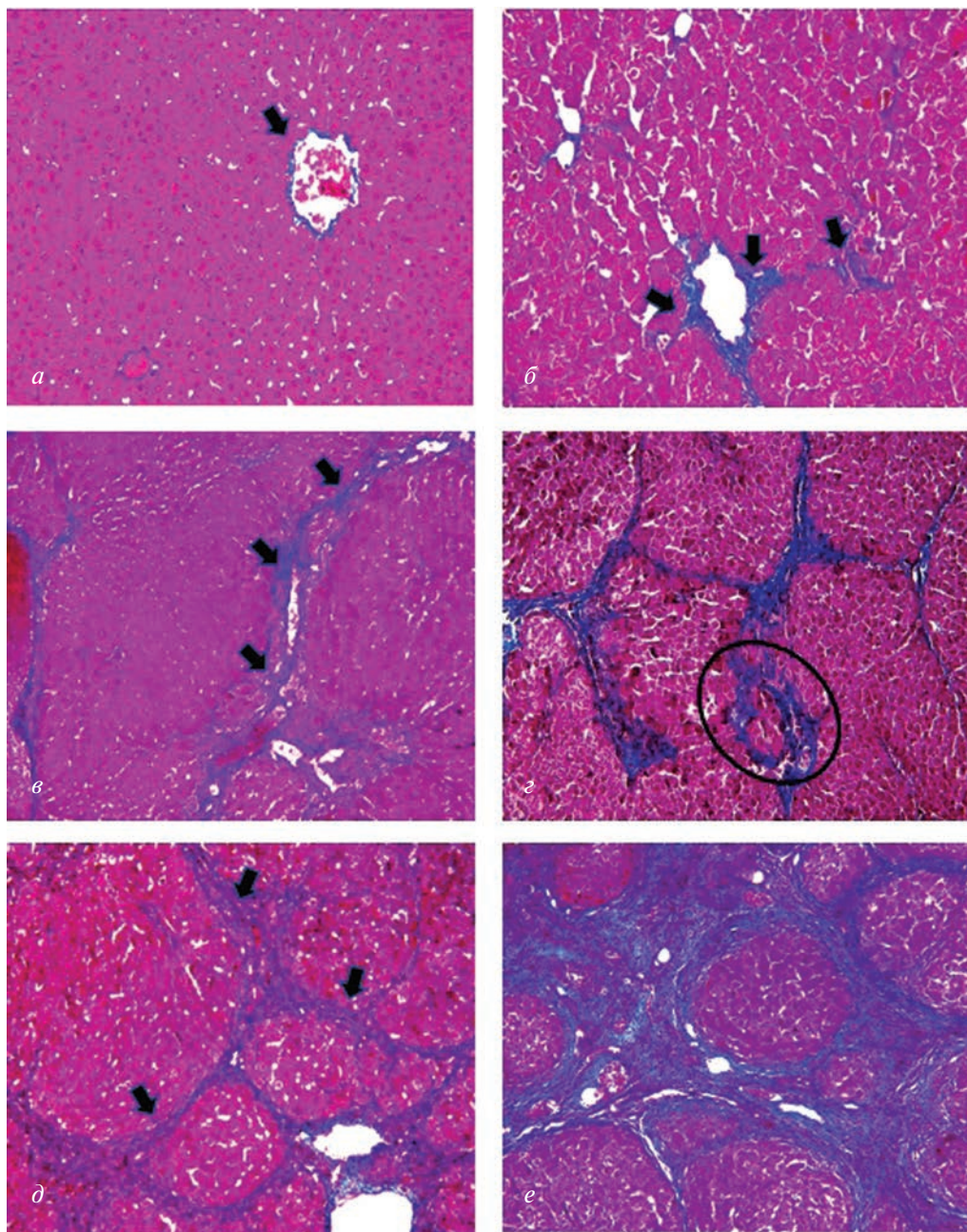
Одно из препятствий при разработке новых методов лечения фиброза печени – значитель-

ный недостаток данных о молекулярных механизмах этого патологического процесса у человека. Это связано с ограниченным доступом к ткани на различных стадиях заболевания. Существует проблема экстраполяции на человека результатов, получаемых на животных. Экспериментальные модели фиброза часто отражают только определенные аспекты патогенеза (воспаление или фиброгенез) не на протяжении всего заболевания [33–35]. Более того, у животных болезни развиваются быстрее, чем у человека. Необходимо помнить, что выборки пациентов значительно более гетерогенны, чем инбредные линии мышей, по внутренним (возраст, пол, сопутствующие заболевания) и внешним (диета, инфекции) факторам, которые могут влиять на уровень экспрессии генов.

В нашей работе для изучения молекулярных механизмов фиброгенеза печени у крыс был выбран ТАА. У лабораторных животных ТАА вызывает поражение печени с морфологическими характеристиками, аналогичными поражениям при фиброзе и циррозе печени у человека, поэтому он признан идеальным для оценки антиоксидантных, цитопротекторных и антифибротических соединений у экспериментальных животных [36, 37]. Нами изучено плавное нарастание прогрессирования фиброза и отслежены все стадии развития цирроза печени у крыс.

У животных контрольной группы отмечено незначительное количество соединительной ткани вокруг междольковых сосудов и желчных протоков портальных зон, центральных и собирательных вен F0 (рис. 1а).

На раннем сроке эксперимента (3 нед.) выявили умеренное формирование фиброзной соединительной ткани в портальных зонах F1 (рис. 1б). По истечении 5 и 7 нед. в паренхиме печени сформировался портальный, мостовидный, местами централобулярный и диффузный перипортальный фиброз со степенью F2/F3 и F3/F4 соответственно (рис. 1в). Через 9 нед. в области отдельных портальных зон наблюдали единичные ложные печеночные дольки, формирование которых отражает начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз F4/F5 (рис. 1г). При дальнейшей интоксикации (11 нед.) определили диффузную перестройку паренхимы печени крыс с формированием ложных печеночных долек – неполный цирроз F5 (рис. 1д). Последующие исследования (13 нед.) показали тотальное поражение печени – достоверный цирроз F6. К концу эксперимента (15 и 17 нед., рис. 1е) отмечено выраженное диффузное разрастание фиброзных соединительно-тканых септ; формирование новых ложных печеночных долек за счет разделения крупных долек тонкими патологическими септами; диффузный портальный, перипортальный и перипортальный фиброз.



**Рис. 1.** Фрагменты печени крыс контрольной группы (*a*) и крыс с индуцированным циррозом через 3 (*б*), 5 (*в*), 9 (*г*), 11 (*д*) и 17 нед. (*е*) после начала эксперимента. Окраска по Маллори.  $\times 40$  (*a*, *б*, *д*, *е*);  $\times 20$  (*в*, *г*). *a* – Центральная вена (стрелка); *б* – фиброзная соединительная ткань (стрелки); *в* – фиброзные септы между портальными зонами (стрелки); *г* – ложная печеночная долька (выделена овальной рамкой); *д* – ложные печеночные дольки (стрелки); *е* – выраженная деструкция печени.

Известно, что процессы инициации и прогрессирования фиброза печени регулируются сотнями генов. Морфологически фиброз и цирроз печени проявляются нарушением пластинчатого строения паренхимы, активацией и трансдифференцировкой (изменение фенотипического профиля) ряда клеток, развитием воспаления, патологическим ангиогенезом и разрастанием фиброзной соединительной ткани. Логичным представляется выбор тех генов-ми-

шеней, которые отвечают за эти патологические процессы. Для выявления и направленного влияния этих генов на данные процессы возникает необходимость в поиске взаимосвязи между генами и определении их как факторов. Факторный анализ – это многомерный метод, который позволяет получить факторы из коррелирующих переменных [38]. С помощью данного статистического метода мы вычисляли корреляционную матрицу уровней экспрессии мРНК выбранных

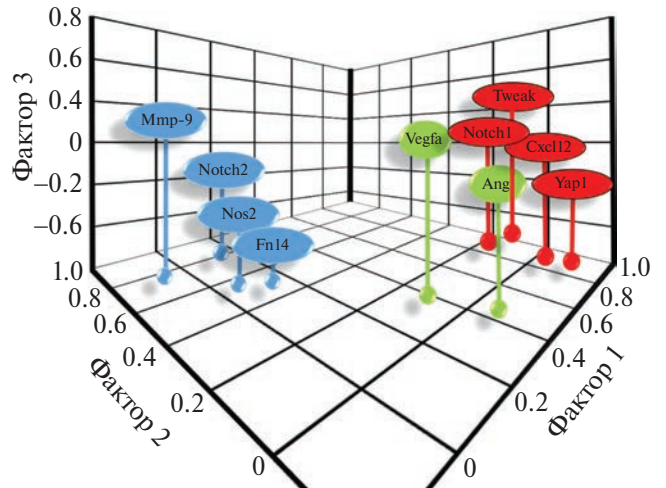


нами генов (*Notch1*, *Notch2*, *Yap1*, *Tweak*, *Fn14*, *Ang*, *Vegfa*, *Cxcl12*, *Nos2* и *Mmp-9*). Затем матрицу анализировали методом главных компонент и извлекали факторы. Фактор – это скрытая переменная, вводимая для объяснения взаимосвязи между исследуемыми генами. Каждый фактор влияет на определенную совокупность генов. В результате получены три фактора, которые объединили высоко коррелирующие гены-мишени между собой (табл. 3). Определяли долю вклада факторов в общую дисперсию. Данные представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Факторные нагрузки (коэффициенты корреляции) по трем извлеченным факторам ( $p < 0.05$ )

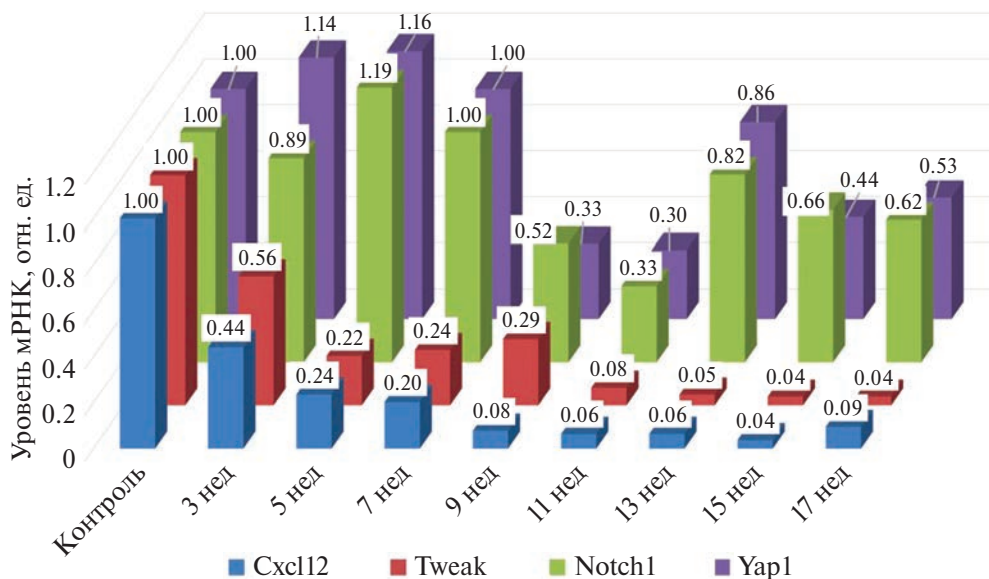
Ген-мишень	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
<i>Ang</i>	0.445	-0.024	<b>0.748</b>
<i>Vegfa</i>	0.417	0.138	<b>0.679</b>
<i>Cxcl12</i>	<b>0.829</b>	-0.024	0.423
<i>Fn14</i>	0.147	0.499	-0.603
<i>Tweak</i>	<b>0.841</b>	0.095	0.313
<i>Mmp9</i>	-0.116	<b>0.791</b>	0.108
<i>Nos2</i>	0.062	0.578	0.007
<i>Notch2</i>	0.135	<b>0.836</b>	-0.175
<i>Notch1</i>	<b>0.848</b>	0.147	0.125
<i>Yap1</i>	<b>0.921</b>	-0.033	0.003
Доля общей дисперсии	0.339	0.196	0.185

Для построения графика полученные факторы вращали по методу “Варимакс”, ортогональному варианту вращения, при котором оси сохраняют взаимное расположение под прямым углом. На рис. 2 представлен график факторов в трехмерных координатах.



**Рис. 2.** График извлеченных факторов в трехмерных координатах.

Первый фактор объединяет наибольшую долю дисперсии признаков (33.95%, табл. 3 и рис. 2) и включает четыре гена-мишени: *Cxcl12* ( $r = 0.829$ ), *Tweak* ( $r = 0.841$ ), *Notch1* ( $r = 0.848$ ), *Yap1* ( $r = 0.921$ ). Этот фактор отражает взаимосвязь исследуемых генов трех сигнальных путей (Notch, TWEAK/Fn14 и Hippo) при фиброгенезе печени в рамках использованной нами экспериментальной модели. При этом следует отметить, что не все изученные гены пути Notch и TWEAK/Fn14 связаны в один фактор. Можно предположить, что гены одного и того же сигнального пути вовлечены в разные молекулярные механизмы. Уровень мРНК *Cxcl12* ( $p = 0.0000$ ) и *Tweak* ( $p = 0.0000$ ) был ниже контрольного уровня на всех этапах эксперимента (рис. 3).



**Рис. 3.** Изменение уровней экспрессии мРНК генов первого фактора при моделировании фиброза и цирроза печени крыс.

Максимальное снижение экспрессии этих генов выявлено при достоверном циррозе F6. Гены *Notch1* и *Yap1* на прогрессирование фиброза печени “реагировали” несколько иначе. Максимальные падения уровня мРНК *Notch1* ( $p < 0.00001$ ) и *Yap1* ( $p < 0.00001$ ) выявлены на стадии неполного цирроза F5 по сравнению с контрольной группой (рис. 3). При этом на стадии F1 экспрессия мРНК *Notch1* ( $p = 0.0773$ ) и *Yap1* на F1 ( $p = 0.3181$ ) и F2/F3 ( $p = 0.5960$ ) не отличалась от контроля. Ген *Yap1* является Notch-за-

висимым геном, что согласуется с опубликованными данными [10–12].

Второй фактор описывает корреляции между генами *Mmp-9* ( $r = 0.791$ ) и *Notch2* ( $r = 0.836$ ) и отражает 19.62% общей дисперсии исследуемых признаков (табл. 3, рис. 2). На стадии F1 экспрессия мРНК *Mmp-9* несколько снизилась. При трансформации фиброза печени в цирроз F4/F5 отмечено повышение уровня мРНК как *Mmp-9*, так и *Notch2* ( $p < 0.00001$ ) по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

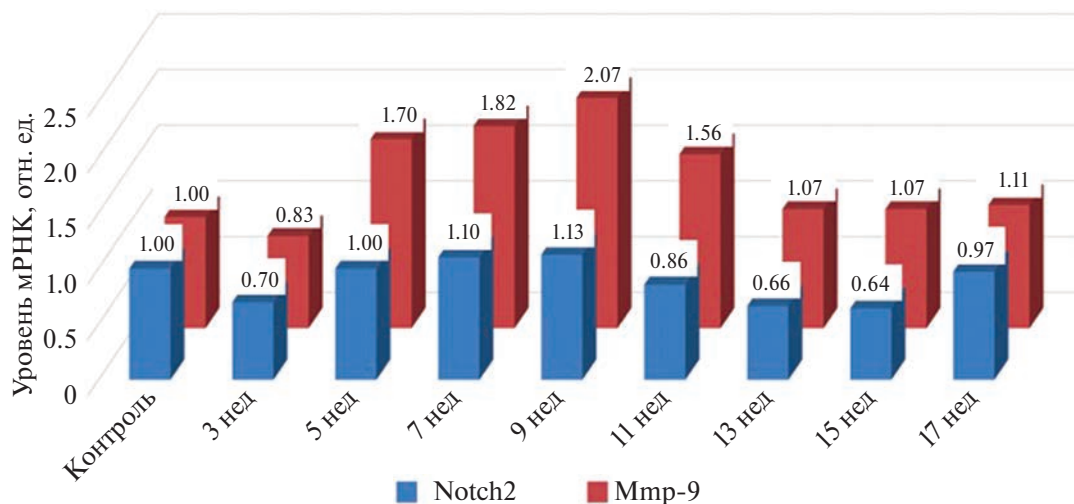


Рис. 4. Изменение уровней экспрессии мРНК генов второго фактора при моделировании фиброза и цирроза печени крыс.

В третий фактор вошли гены *Ang* ( $r = 0.748$ ) и *Vegfa* ( $r = 0.679$ ). Этот фактор описывает 18.51% общей дисперсии (табл. 3, рис. 2). Уровни экспрессии этих генов были снижены на протяжении всего эксперимента по сравне-

нию с контрольной группой. На стадии достоверного цирроза F6 отмечено максимальное падение уровня мРНК *Ang* ( $p < 0.00001$ ), а мРНК *Vegfa* – в 6.62 раза ( $p < 0.00001$ , рис. 5).

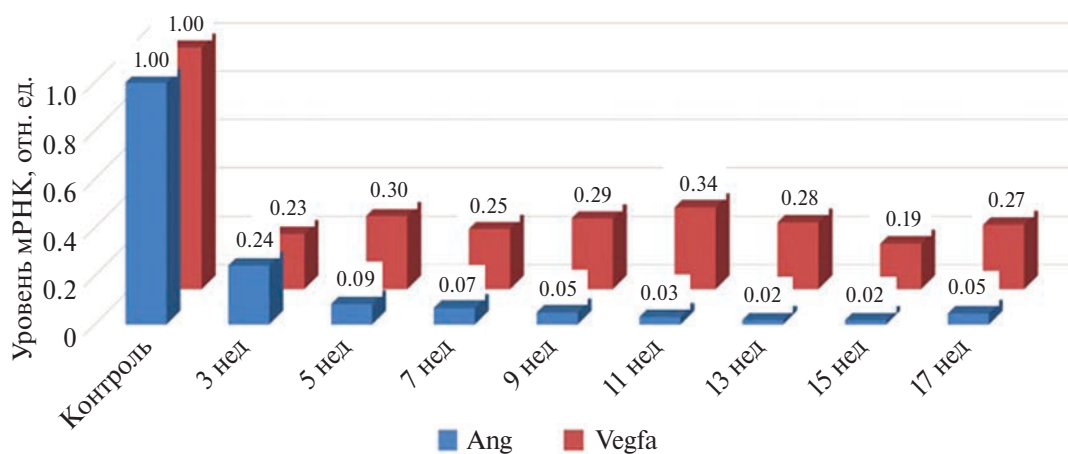


Рис. 5. Изменение уровней экспрессии мРНК генов третьего фактора при моделировании фиброза и цирроза печени крыс.

Ранее нами были описаны структурно-функциональные нарушения сосудистого русла печени крыс и, в частности, установленный венозный ангиогенез [39]. Согласно опубликованным данным, *Ang* и *Vegfa* кодируют проангиогенные факторы [18–20], но в настоящем исследовании их экспрессия снизилась.

Гены *Nos2* и *Fn14* не вошли ни в один из факторов. Судя по факторным нагрузкам, ген *Fn14* нельзя присоединять ни к одному из факторов. Согласно графику нагрузок в трехмерных координатах (рис. 2), ген *Nos2* можно включить во второй фактор.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с помощью факторного анализа получены три фактора, которые объединили между собой гены-мишени, имеющие сильную корреляционную связь. Первый фактор включает четыре гена: *Cxcl12* ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ), *Tweak* ( $r = 0.841$ ,  $p < 0.05$ ), *Notch1* ( $r = 0.848$ ,  $p < 0.05$ ), *Yap1* ( $r = 0.921$ ,  $p < 0.05$ ). Второй фактор описывает корреляции между генами *Mmp-9* ( $r = 0.791$ ,  $p < 0.05$ ) и *Notch2* ( $r = 0.836$ ,  $p < 0.05$ ). В третий фактор вошли гены *Ang* ( $r = 0.748$ ,  $p < 0.05$ ) и *Vegfa* ( $r = 0.679$ ,  $p < 0.05$ ). Гены *Nos2* и *Fn14* не вошли ни в один из факторов. Анализ генов, классифицированных по уровню экспрессии мРНК, позволяет предположить существование патогенетической взаимосвязи продуктов этих генов в процессах фиброзных изменений печени токсической этиологии. Несомненно, полученные результаты представляют фундаментальный интерес для изучения патогенетических механизмов развития фиброза и цирроза печени.

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки – медицине” Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 “Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении” (регистрационный номер 20190107).

Протокол эксперимента одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования “Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет” (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Сове-

та ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994–1996).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang D., Zhang Y., Sun B. (2022) The molecular mechanisms of liver fibrosis and its potential therapy in application. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(20), 12572. doi: 10.3390/ijms232012572
- Graupera I., Isus L., Coll M., Pose E., Díaz A., Vallverdú J., Rubio-Tomás T., Martínez-Sánchez C., Huelin P., Llopis M., Solé C., Fondevila C., Lozano J.J., Sancho-Bru P., Ginès P., Aloy P. (2022) Molecular characterization of chronic liver disease dynamics: from liver fibrosis to acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep.* **4**(6), 100482. doi: 10.1016/j.jhepr.2022.100482
- Kachanova O., Lobov A., Malashicheva A. (2022) The role of the Notch signaling pathway in recovery of cardiac function after myocardial infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(20), 12509. doi: 10.3390/ijms232012509
- Yuan C., Ni L., Zhang C., Wu X. (2020) The role of Notch3 signaling in kidney disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, 1809408. doi: 10.1155/2020/1809408
- Salazar J.L., Yang S.A., Yamamoto S. (2020) Post-developmental roles of notch signaling in the nervous system. *Biomolecules.* **10**(7), 985. doi: 10.3390/biom10070985
- Hosseini-Alghaderi S., Baron M. (2020) Notch3 in development, health and disease. *Biomolecules.* **10**(3), 485. doi: 10.3390/biom10030485
- Chen Y., Gao W.K., Shu Y.Y., Ye J. (2022) Mechanisms of ductular reaction in non-alcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **28**(19), 2088–2099. doi: 10.3748/wjg.v28.i19.2088
- Vera L., Garcia-Olloqui P., Petri E., Viñado A.C., Valera P.S., Blasco-Iturri Z., Calvo I.A., Cenzano I., Ruppert C., Zulueta J.J., Prosper F., Saez B., Pardo-Saganta A. (2021) Notch3 deficiency attenuates pulmonary fibrosis and impedes lung-function decline. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **64**(4), 465–476. doi: 10.1165/rcmb.2020-0516OC
- Adams J.M., Jafar-Nejad H. (2019) The roles of notch signaling in liver development and disease. *Biomolecules.* **9**(10), 608. doi: 10.3390/biom9100608
- Pelullo M., Zema S., Nardoza F., Checquolo S., Screpanti I., Bellavia D. (2019) Wnt, Notch, and TGF- $\beta$  pathways impinge on hedgehog signaling complexity: an open window on cancer. *Front. Genet.* **10**, 711. doi: 10.3389/fgene.2019.00711
- Dai Y., Hao P., Sun Z., Guo Z., Xu H., Xue L., Song H., Li Y., Li S., Gao M., Si T., Zhang Y., Qi Y. (2021) Liver knockout *YAP* gene improved insulin resistance-induced hepatic fibrosis. *J. Endocrinol.* **249**(2), 149–161. doi: 10.1530/JOE-20-0561

12. Yu H.X., Yao Y., Bu F.T., Chen Y., Wu Y.T., Yang Y., Chen X., Zhu Y., Wang Q., Pan X.Y., Meng X.M., Huang C., Li J. (2019) Blockade of YAP alleviates hepatic fibrosis through accelerating apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells. *Mol. Immunol.* **107**, 29–40. doi: 10.1016/j.molimm.2019.01.004
13. Zheng C., Luo J., Yang Y., Dong R., Yu F.X., Zheng S. (2021) YAP activation and implications in patients and a mouse model of biliary atresia. *Front. Pediatr.* **8**, 618226. doi: 10.3389/fped.2020.618226
14. He X., Tolosa M.F., Zhang T., Goru S.K., Ulloa Severino L., Misra P.S., McEvoy C.M., Caldwell L., Szeto S.G., Gao F., Chen X., Atin C., Ki V., Vukosa N., Hu C., Zhang J., Yip C., Krizova A., Wrana J.L., Yuen D.A. (2022) Myofibroblast YAP/TAZ activation is a key step in organ fibrogenesis. *JCI Insight.* **7**(4), e146243. doi: 10.1172/jci.insight.146243
15. Wang M., Xie Z., Xu J., Feng Z. (2020) TWEAK/Fn14 axis in respiratory diseases. *Clin. Chim. Acta.* **509**, 139–148. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.007
16. Dwyer B.J., Jarman E.J., Gogoi-Tiwari J., Ferreira-Gonzalez S., Boulter L., Guest R.V., Kendall T.J., Kurian D., Kilpatrick A.M., Robson A.J., O'Duibhir E., Man T.Y., Campana L., Starkey Lewis P.J., Wigmore S.J., Olynyk J.K., Ramm G.A., Tirtitz-Parker J.E.E., Forbes S.J. (2021) TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J. Hepatol.* **74**(4), 860–872. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.018
17. Zhang Y., Zeng W., Xia Y. (2021) TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis. *J. Cell. Physiol.* **236**(5), 3304–3316. doi: 10.1002/jcp.30089
18. Lin Y., Dong M.Q., Liu Z.M., Xu M., Huang Z.H., Liu H.J., Gao Y., Zhou W. (2022) A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *J. Hepatology.* **76**(3), 660–675. doi: 10.1002/hep.32299
19. Lefere S., Devisscher L., Geerts A. (2020) Angiogenesis in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Gastroenterol. Belg.* **83**(2), 301–307.
20. Yang L., Yue W., Zhang H., Zhang Z., Xue R., Dong C., Liu F., Chang N., Yang L., Li L. (2022) Dual targeting of angipoinetin-1 and von Willebrand factor by microRNA-671-5p attenuates liver angiogenesis and fibrosis. *Hepatology. Commun.* **6**(6), 1425–1442. doi: 10.1002/hep4.1888
21. Friedman S.L., Pinzani M. (2022) Hepatic fibrosis 2022: unmet needs and a blueprint for the future. *Hepatology.* **75**(2), 473–488. doi: 10.1002/hep.32285
22. Ray P., Stacer A.C., Fenner J., Cavnar S.P., Meguiar K., Brown M., Luker K.E., Luker G.D. (2015) CXCL12- $\gamma$  in primary tumors drives breast cancer metastasis. *Oncogene.* **34**(16), 2043–2051. doi: 10.1038/onc.2014.157
23. Cui L.N., Zheng X.H., Yu J.H., Han Y. (2021) Role of CXCL12-CXCR4/CXCR7 signal axis in liver regeneration and liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* **29**(9), 900–903. doi: 10.3760/cma.j.cn501113-20200721-00403
24. Chiraunyanann T., Changsri K., Sretapunya W., Yuenyongchaiwat K., Akekawatchai C. (2019) CXCL12 G801A polymorphism is associated with significant liver fibrosis in HIV-infected Thais: a cross-sectional study. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **37**(3), 162–170. doi: 10.12932/AP-160917-0162
25. Zhang J., Li Y., Liu Q., Li R., Pu S., Yang L., Feng Y., Ma L. (2018) SKLB023 as an iNOS inhibitor alleviated liver fibrosis by inhibiting the TGF-beta/Smad signaling pathway. *RSC Adv.* **8**(54), 30919–30924. doi: 10.1039/c8ra04955f
26. Ahmad N., Ansari M.Y., Haqqi T.M. (2020) Role of iNOS in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects. *J. Cell Physiol.* **235**(10), 6366–6376. doi: 10.1002/jcp.29607
27. Kashfi K., Kannikal J., Nath N. (2021) Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of iNOS-derived NO. *Cells.* **10**(11), 3194. doi: 10.3390/cells10113194
28. Tsomidis I., Notas G., Xidakis C., Voumvouraki A., Samonakis D.N., Koulentaki M., Kouroumalis E. (2022) Enzymes of fibrosis in chronic liver disease. *Biomedicines.* **10**(12), 3179. doi: 10.3390/biomedicines10123179
29. Lachowski D., Cortes E., Rice A., Pinato D., Rombouts K., Hernandez A.D.R. (2019) Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis. *Sci. Rep.* **9**(1), 7299. doi: 10.1038/s41598-019-43759-6
30. Maltais L.J., Blake J.A., Chu T., Lutz C.M., Eppig J.T., Jackson I. (2002) Rules and guidelines for mouse gene, allele, and mutation nomenclature: a condensed version. *Genomics.* **79**(4), 471–474. doi: 10.1006/geno.2002.6747
31. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenon J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima C., Litman H.J. (2010) HALT-C Trial Group. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology.* **51**(2), 585–594. doi: 10.1002/hep.23315
32. Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С. (2022) Динамика стабильности экспрессии генов *sdha*, *hpri*, *prl3d1* и *hes1* в рамках моделирования фиброза печени крыс. *Молекуляр. медицина.* **20**(2), 53–62. doi: 10.29296/24999490-2022-02-08
33. Sharma N., Shaikh T.B., Eedara A., Kuncha M., Sistla R., Andugulapati S.B. (2022) Dehydrozingerone ameliorates thioacetamide-induced liver fibrosis via inhibition of hepatic stellate cells activation through modulation of the MAPK pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **937**, 175366. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175366
34. Chandrashekar D.V., DuBois B.N., Rashid M., Mehvar R. (2023) Effects of chronic cirrhosis induced by intraperitoneal thioacetamide injection on the protein content and Michaelis-Menten kinetics of cytochrome P450 enzymes in the rat liver microsomes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **132**(2), 197–210. doi: 10.1111/bcpt.13813
35. Shareef S.H., Al-Medhtiy M.H., Al Rashdi A.S., Aziz P.Y., Abdulla M.A. (2023) Hepatoprotective ef-

- fect of pinostrobin against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **30**(1), 103506. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103506
36. Walther C.P., Benoit J.S. (2021) Tubular kidney biomarker insights through factor analysis. *Am. J. Kidney Dis.* **78**(3), 335–337. doi: 10.1053/j.ajkd.2021.03.016
37. Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N.H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. (2019) A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation. *Sci. Rep.* **9**(1), 15446. doi: 10.1038/s41598-019-51189-7
38. Ezhilarasan D. (2023) Molecular mechanisms in thioacetamide-induced acute and chronic liver injury models. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 104093. doi: 10.1016/j.etap.2023.104093
39. Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С. (2022) Взаимное снижение уровня мРНК ANG и VEGF при прогрессирующем ангиогенезе венозной системы печени крыс Wistar в экспериментальном циррозе. *Молекуляр. медицина.* **20**(2), 53–61.

## Analysis of the Relationship between *Cxcl12*, *Tweak*, *Notch1* and *Yap1* mRNA Expression in the Molecular Mechanisms of Liver Fibrogenesis

E. I. Lebedeva<sup>1</sup>\*, A. T. Shchastniy<sup>1</sup>, A. S. Babenka<sup>2</sup>, and D. A. Zinovkin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, 210009 Republic of Belarus

<sup>2</sup> Belarussian State Medical University, Minsk, 220116 Republic of Belarus

<sup>3</sup> Gomel State Medical University, Gomel, 246050 Republic of Belarus

\*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Currently, data on the molecular mechanisms of fibrosis and cirrhosis of the liver do not allow us to fully understand all the stages in the development of these pathological processes. It is known that individual genes and signaling pathways do not function independently. Relations between them play a huge role in the implementation of their functions. Due to the complexity of studying this factor, information about their relationship is insufficient and often contradictory. In the present work, for the first time at different stages of thioacetamide-induced fibrosis in the liver of Wistar rats, mRNA expression of *Notch1*, *Notch2*, *Yap1*, *Tweak* (*Tnfrsf12*), *Fn14* (*Tnfrsf12a*), *Ang*, *Vegfa*, *Cxcl12* (*Sdf*), *Nos2*, and *Mmp-9* genes was studied in detail. Using factor analysis, three factors were obtained that combined highly correlated target genes with each other. The first factor includes four genes: *Cxcl12* ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ), *Tweak* ( $r = 0.841$ ,  $p < 0.05$ ), *Notch1* ( $r = 0.848$ ,  $p < 0.05$ ), *Yap1* ( $r = 0.921$ ,  $p < 0.05$ ). The second factor describes the correlations between the *Mmp-9* ( $r = 0.791$ ,  $p < 0.05$ ) and *Notch2* ( $r = 0.836$ ,  $p < 0.05$ ) genes. The third factor included genes *Ang* ( $r = 0.748$ ,  $p < 0.05$ ) and *Vegfa* ( $r = 0.679$ ,  $p < 0.05$ ). The *Nos2* and *Fn14* genes were not included in any of the factors. The selected genes classified on the basis of mRNA expression levels suggest that their products have a pathogenetic relationship in the processes of fibrotic changes in the liver of toxic etiology. Undoubtedly, the results obtained are of fundamental interest and require further expansion in the study of fibrosis and cirrhosis of the liver.

**Keywords:** rat, liver fibrosis, mRNA expression, factor analysis

УДК 577.12

## МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ АВТ-737 В КЛЕТКАХ ОСТРОГО МОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ТНР-1

© 2024 г. А. И. Ломовский<sup>a</sup>, Ю. Л. Бабурина<sup>a</sup>, Р. С. Фадеев<sup>a</sup>, М. И. Кобякова<sup>a, b</sup>,  
Я. В. Ломовская<sup>a</sup>, Р. Р. Крестинин<sup>a</sup>, Л. Д. Сотникова<sup>a</sup>, О. В. Крестинина<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино,  
Московская обл., 142290 Россия

<sup>b</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, 630117 Россия

\*e-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 26.07.2023 г.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) – гормон, синтезируемый шишковидной железой. Благодаря онкостатическому действию мелатонин можно рассматривать как противоопухолевое средство и использовать в комбинированной терапии опухолей. АВТ-737, ингибитор Vcl-2, способствует гибели клеток после обработки агентами, индуцирующими проапоптотические сигналы. В настоящей работе изучено совместное действие мелатонина и АВТ-737 на изменение пролиферативной и митотической активности клеток, мембранного потенциала митохондрий, внутриклеточной продукции активных форм кислорода и цитозольного  $Ca^{2+}$ . Изучено также изменение экспрессии анти- и проапоптотических белков (Vcl-2 и Вах), маркеров аутофагии (LC3A/B (I, II) и стресса эндоплазматического ретикулаума (шаперонов VIP и PDI, СНОР). Совместное действие мелатонина и АВТ-737 приводило к повышению уровня цитозольного  $Ca^{2+}$ , внутриклеточной продукции активных форм кислорода и снижению мембранного потенциала митохондрий. Содержание Vcl-2 в этих условиях снижалось, в то время как уровень Вах повышался. Активация СНОР стимулировала аутофагию и приводила к снижению синтеза шаперонов VIP и PDI. Предполагается, что мелатонин способен усиливать действие других химиотерапевтических агентов и может использоваться в терапии опухолей.

**Ключевые слова:** острый моноцитарный лейкоз, мелатонин, АВТ-737, аутофагия, ЭПР-стресс

**DOI:** 10.31857/S0026898424010136, **EDN:** NWVCMU

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания признаны глобальной проблемой современной медицины, которая не имеет полноценного решения. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – гетерогенное злокачественное клональное заболевание кроветворной системы, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией незрелых, аномальных бластных клеток и нарушением продукции нормальных клеток крови [1]. Основой консервативного лечения данного заболевания является применение химиотерапевтических ДНК-тропных препаратов (цитарабина (ЦИТ), доксорубицина и т.д.) [2]. В случае острого промиелоцитарного лейкоза (вариант ОМЛ с преобладанием аномальных промиелоцитов) в качестве дифференцирующей терапии используется транс-ретиноевая кислота (АТРА) [3]. Применяют также таргетную тера-

пию, направленную на различные компоненты внутриклеточных механизмов выживания опухолевых клеток. Один из препаратов таргетной терапии – АВТ-737 [4] – ингибитор Vcl<sub>XL</sub>, Vcl-2 и Vcl<sub>w</sub>, связывающийся с гидрофобной бороздкой и предотвращающий секвестрацию проапоптотических белков, таких как BAX и Bim [5].

Эффективность терапии ОМЛ снижается с увеличением возраста пациента. Это связано в первую очередь с побочным (неспецифическим) действием традиционных химиотерапевтических препаратов, в равной степени индуцирующих гибель как лейкозных бластов, так и здоровых клеток, прежде всего гемопоэтических клеток костного мозга [6]. Чтобы устранить побочное действие химиопрепаратов и повысить эффективность терапии ОМЛ необходимо уменьшить дозы противоопухолевых агентов,

применяемых в клинике, и добавить эффективные препараты, не обладающие собственной токсичностью, но повышающие эффективность низких доз основных противоопухолевых препаратов.

Одним из перспективных препаратов, применяемых в терапии ОМЛ, является гормон шишковидной железы мелатонин (МЕЛ) — N-ацетил-5-метокситриптамин, производное биогенного амина серотонина. Амфифильные свойства МЕЛ позволяют ему легко проникать через клеточную мембрану и достигать любой клеточной структуры [7]. Исследования последних лет показали, что МЕЛ обладает онкостатической активностью в отношении опухолей разного типа. Противоопухолевую активность МЕЛ наблюдали при раке кожи [8], желудочно-кишечного тракта [9], молочной железы [10], а также при глиоме [11] и лейкозе [12]. Причем в некоторых типах опухолевых клеток МЕЛ может не только подавлять пролиферацию, но и модулировать проапоптотические сигнальные пути [13]. МЕЛ действует синергично с другими химиотерапевтическими агентами, усиливая их воздействие на лейкозные клетки. Кроме того, он способен супрессировать опухолевые клетки, не проявляя при этом токсического действия [14]. Показано, что использование МЕЛ в нетоксической концентрации совместно с низкими дозами противоопухолевых препаратов может усиливать токсическое действие этих препаратов в отношении клеток рака легкого [15], меланомы [16], плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) [17] и толстой кишки [18], что приводит к снижению их токсического действия на здоровые клетки.

Ранее мы изучали действие как одного МЕЛ, так и в комбинации со сниженными нетоксичными концентрациями противоопухолевых препаратов разных фармакологических групп, таких как АТРА, ЦИТ и АВТ-737, на клетки MV4-11 (модель ОМЛ) и клетки HL-60 (модель ОПЛ) [19–23]. Нами показано, что в концентрации 1 мМ МЕЛ повышал цитотоксическое действие таких препаратов, как АТРА, ЦИТ, АВТ-737, что приводило к снижению количества жизнеспособных клеток, а также к снижению их пролиферативной и митотической активности. Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) считается основным процессом при различных патологических состояниях, т.е. его усиление подразумевает наличие той или иной патологии [24]. Мы наблюдали, что МЕЛ совместно с противоопухолевыми препаратами снижал содержание таких маркеров ЭПР-стресса, как иммуноглобулинсвязывающий белок ВІР и протеиндисульфидизомеразы (PDI). Это ослабляло защиту клеток ОМЛ от стресс-индуцированного апоптоза и приводило к активации такого про-

апоптотического фактора, как белок СНОР, гомологичный С/ЕВР. Известно, что ЭПР-стресс может запускать аутофагию, которая представляет собой многоэтапный процесс самодеградаций клеточных компонентов, в котором белки и органеллы изолируются и модифицируются внутри аутофагосом — цитоплазматических двуслойных мембранных везикул, а затем переносятся в лизосомы [25, 26]. Показано, что окислительный стресс является инициатором и основным фактором как ЭПР-стресса, так и аутофагии [27], хотя основные механизмы, ответственные за эти события, до сих пор неизвестны.

Нами изучено влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение пролиферативной активности, мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ), цитозольного  $Ca^{2+}$ , продукцию АФК, а также изменения экспрессии маркеров ЭПР-стресса (ВІР, PDI, СНОР) и аутофагии в клетках острого моноцитарного лейкоза (ОМоЛ) ТНР-1. ОМоЛ считается одной из разновидностей ОМЛ, при которой бластные клетки в костном мозге и крови в основном представлены предшественниками моноцитов. Клеточная линия ТНР-1, выделенная из периферической крови годовалого мальчика с ОМоЛ [28], является моделью ОМоЛ и широко используется при проведении исследований, при этом клетки этой линии находятся не только в моноцитарном, но и в макрофагоподобном состоянии [29, 30].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клеточные культуры и условия культивирования.** Линия клеток ТНР-1 (ТІВ-202), происходящая из клеток ОМоЛ человека, получена из коллекции клеточных культур АТСС (США). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 (“Sigma-Aldrich”, США), содержащей 100 мкг/мл сульфата канамицина (“ПанЭко”, Россия) и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Gibco”, США) в  $CO_2$ -инкубаторе (37°C, влажность 95% и 5%  $CO_2$ ).

**Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов на клетки ОМоЛ.** Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. Клетки (плотность  $5 \times 10^3$  клеток/лунку) высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали МЕЛ (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 1–10 000 мкМ и АВТ-737 (“Thermo Fisher Scientific”, США) (от 0.001 до 10 мкМ). Через 24 ч после добавления исследуемых веществ в каждую лунку вносили резазурин (“Sigma-Aldrich”) в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 4 ч в  $CO_2$ -инкубаторе. Флуоресцентный

анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 (“Tecan”, Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

**Выделение моноцитов из периферической крови человека.** Моноциты получены из мононуклеарной фракции периферической крови здоровых доноров с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (“Biolegend”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Моноциты культивировали в среде RPMI/F12 с добавлением 10% FBS, 40 мкг/мл гентамицина в 96-луночном планшете в концентрации  $5 \times 10^3$  кл./луночку в течение 24 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 95%).

**Анализ митотической активности клеток ТНР-1.** Для определения митотической активности клетки сначала инкубировали с исследуемыми веществами в течение 24 ч, а затем центрифугировали (4 мин, 250 g), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки окрашивали бисбензимидам H33342 (“Sigma-Aldrich”). Митотические клетки подсчитывали, используя флуоресцентный микроскоп DM6000 (“Leica”, ФРГ). Митотический индекс рассчитывали по формуле  $MI = (P + M + A + T)/N$ , где  $P + M + A + T$  – сумма всех клеток в фазе профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно, а  $N$  – общее количество клеток.

**Влияние исследуемых препаратов на жизнеспособность клеток ОМЛ.** Пролиферативную активность и гибель клеток определяли с использованием красителя трипанового синего (“Sigma-Aldrich”). Культивируемые клетки центрифугировали в течение 4 мин при 250 g, а затем промывали раствором PBS. Для оценки количества и жизнеспособности клеток использовали 0.4%-ный раствор трипанового синего. Опыты проводили не менее чем в 10 повторях.

**Измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода (АФК).** Продукцию АФК анализировали с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA, Ex-485 нм/Em-530 нм, “Sigma-Aldrich”). Для анализа продукции АФК к клеткам ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) добавляли 10 мкМ DCFH-DA, после чего инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 10 мин. После этого клетки однократно промывали в PBS. В качестве положительного контроля использовали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 мкМ). Изменение окислительной активности

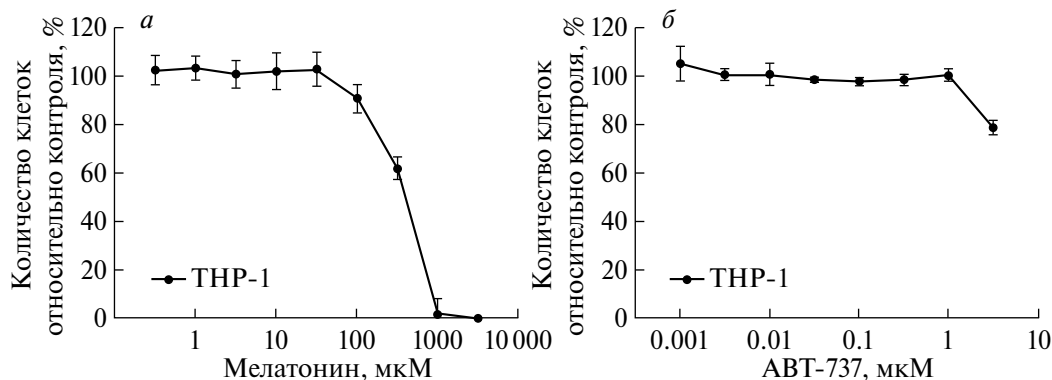
определяли на проточном цитометре BD Accuri C6 (“Biosciences”).

**Измерение мембранного потенциала митохондрий в клетках ТНР-1.** Митохондриальный потенциал определяли с использованием флуоресцентного красителя 3,3'-дигексилосакарбонцианиниодида DiOC6(3) (“Sigma-Aldrich”) (Ex-482 нм/Em-501 нм). К суспензии клеток ( $10^6$  клеток/мл) добавляли 10 нМ DiOC6(3) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 30 мин. Клетки однократно промывали в PBS. В качестве положительного контроля использовали 0.5%-ный сапонин. Изменение мембранного потенциала оценивали с использованием проточного цитометра BD Accuri C6 (“Biosciences”).

**Измерение содержания цитозольного Ca<sup>2+</sup> в клетках ТНР-1.** Изменение содержания цитозольного Ca<sup>2+</sup> определяли с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM (“Sigma-Aldrich”) (Ex-494 нм/Em-516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного Ca<sup>2+</sup> клетки ( $10^6$  клеток/мл) отмывали в PBS. К клеточной суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS. Содержание Ca<sup>2+</sup> в цитозоле измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (“Biosciences”).

**Электрофорез и иммуноблот-анализ.** К клеткам ТНР-1 добавляли выбранные количества МЕЛ (1000 мкМ) и АВТ-737 (2 и 7 мкМ). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS. Клетки центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солибилизировали в лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеиназы/фосфатазы. После встряхивания на шейкере при 4°C в течение 2 ч образцы центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка в супернатантах измеряли по методу Брэдфорда. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов Лэммли (“Bio-Rad”, США), нагревали до 95°C в течение 3 мин. Белки лигата разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (SDS) в 12.5%-ном полиакриламидном геле. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) с помощью Вестерн-блотинга (“Bio-Rad”). Мембрану блокировали в растворе Roti-block (“Carl Roth GmbH & Co.”, Германия) при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Моноклональные антитела к белку, гомологичному С/ЕВР (СНОР), к LC3A/B-I/II и поликлональные антитела к PDI, белку VIP, получены от “Cell Signaling”





**Рис. 1.** Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов МЕЛ (а) и АВТ-737 (б) в клетках ТНР-1. Долю жизнеспособных клеток определяли через 24 ч после добавления веществ по интенсивности восстановления резазурина. Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью  $5 \times 10^3$  клеток на лунку и обрабатывали веществами в разных концентрациях. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 6$ ).

(США). Моноклональные антитела к Bcl-2 получены из “Santa Cruz Biotechnology” (США), моноклональные антитела к BAX были фирмы “Abcam” (Великобритания). Для нормирования использовали антитела к анти-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, “Cell Signaling”). Белковые полосы визуализировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System, “Bio-Rad”).

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием однофакторного метода ANOVA и апостериорного анализа Стьюдента–Ньюмана–Кеулса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

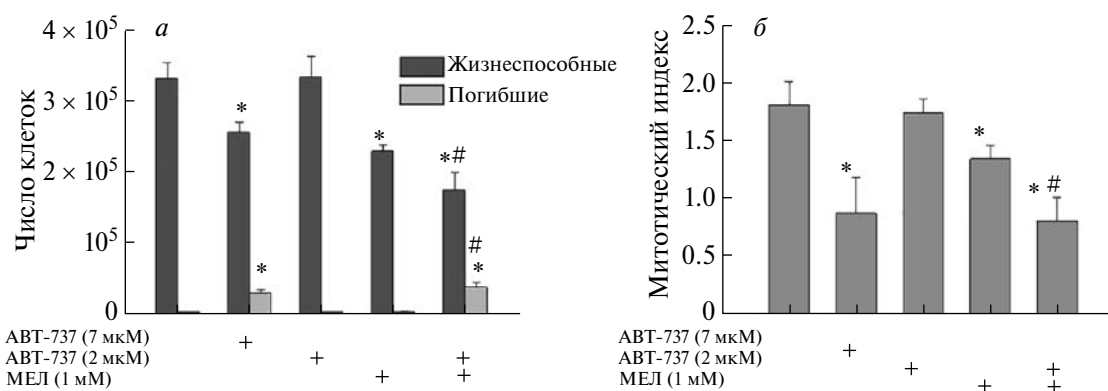
Сначала мы проверили цитотоксический эффект МЕЛ (рис. 1а) и химиотерапевтического препарата АВТ-737 на клетках ТНР-1, служащих моделью клеток ОМЛ. Чтобы выявить цитотоксическое действие препаратов, клетки культивировали в течение 24 ч с МЕЛ в концентрации от 1 до 10 000 мкМ и АВТ-737 — от 0.001 до 10 мкМ (рис. 1). Из рис. 1а видно, что в низких концентрациях МЕЛ (до 100 мкМ) не оказывал влияния на жизнеспособность клеток ТНР-1. Однако в случае 1 мМ МЕЛ жизнеспособность клеток уменьшалась на 15% относительно контроля, а с увеличением концентрации до 10 мМ снижалась почти на 100%. Аналогичным образом мы подобрали нетоксичную концентрацию АВТ-737 (рис. 1б). Из рис. 1 видно, что АВТ-737 в концентрации до 5 мкМ не влиял на жизнеспособность клеток ТНР-1, при увеличении концентрации до 10 мкМ жизнеспособность клеток снижалась на 20%.

Для оценки жизнеспособности клеток мы выбрали концентрации АВТ-737 (2 и 7 мкМ)

и МЕЛ (1 мМ). Поскольку токсичность химиотерапевтических препаратов остается проблемой при лечении рака, мы использовали низкую концентрацию АВТ-737 в сочетании с нетоксичной концентрацией МЕЛ.

Далее мы оценили влияние АВТ-737 и МЕЛ на пролиферативную активность и гибель клеток (рис. 2а). Мы наблюдали, что АВТ-737 (7 мкМ) снижал на 20% число жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (столбец 2 vs. 1). В присутствии АВТ-737 (7 мкМ) количество погибших клеток увеличивалось в 10 раз по сравнению с контролем (столбцы 2 vs. 1). Действие АВТ-737 (2 мкМ) на жизнеспособные клетки и число погибших клеток оставались в пределах контрольных значений (столбец 3 vs. 1). Добавление МЕЛ (1 мМ) приводило к снижению числа жизнеспособных клеток на 35% относительно контроля, при этом количество погибших клеток не изменялось (столбец 4 vs. 1). Совместное действие МЕЛ и АВТ-737 в сниженной концентрации уменьшало количество жизнеспособных клеток примерно в 2 раза по сравнению с контролем и на 50% по сравнению с АВТ-737. Количество погибших клеток ТНР-1 при комбинированном действии МЕЛ с АВТ-737 увеличилось в 12 раз относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и в 10 раз по сравнению только с АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

Известно, что МЕЛ способен снижать пролиферацию опухолевых клеток, например клеток рака молочной железы человека MCF-7 и гипофиза GH3 [31, 32], поэтому снижение числа жизнеспособных клеток в присутствии МЕЛ и при совместном применении МЕЛ и АВТ-737 в низкой концентрации может быть связано со снижением их митотической активности. На следующем этапе мы оценили влияние АВТ-737 и МЕЛ на изменение митотиче-

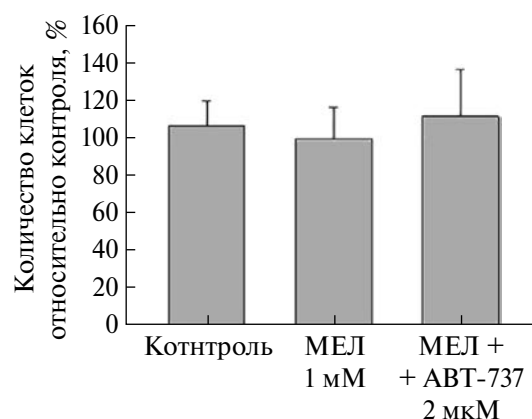


**Рис. 2.** Жизнеспособность и митотическая активность клеток ТНР-1 после 24 ч инкубации с МЕЛ и АВТ-737. *а* – Изменение пролиферации. *б* – Изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Количество жизнеспособных клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принимали равным 100%. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

ского индекса (МИ) клеток ТНР-1 (рис. 2б). АВТ-737 (7 мкМ) уменьшал МИ клеток ТНР-1 на 50% (столбец 2 vs. 1). АВТ-737 в сниженной концентрации не влиял на МИ (столбец 3 vs. 1), тогда как МЕЛ снижал МИ на 30% по сравнению с контролем (столбец 4 vs. 1). При совместном действии АВТ-737 и МЕЛ МИ уменьшался в 2 раза по сравнению с контролем (столбец 5 vs. 1) и на 60% по сравнению с одним АВТ-737 (2 мкМ) (столбец 5 vs. 3). Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ способен усиливать цитотоксическое действие АВТ-737.

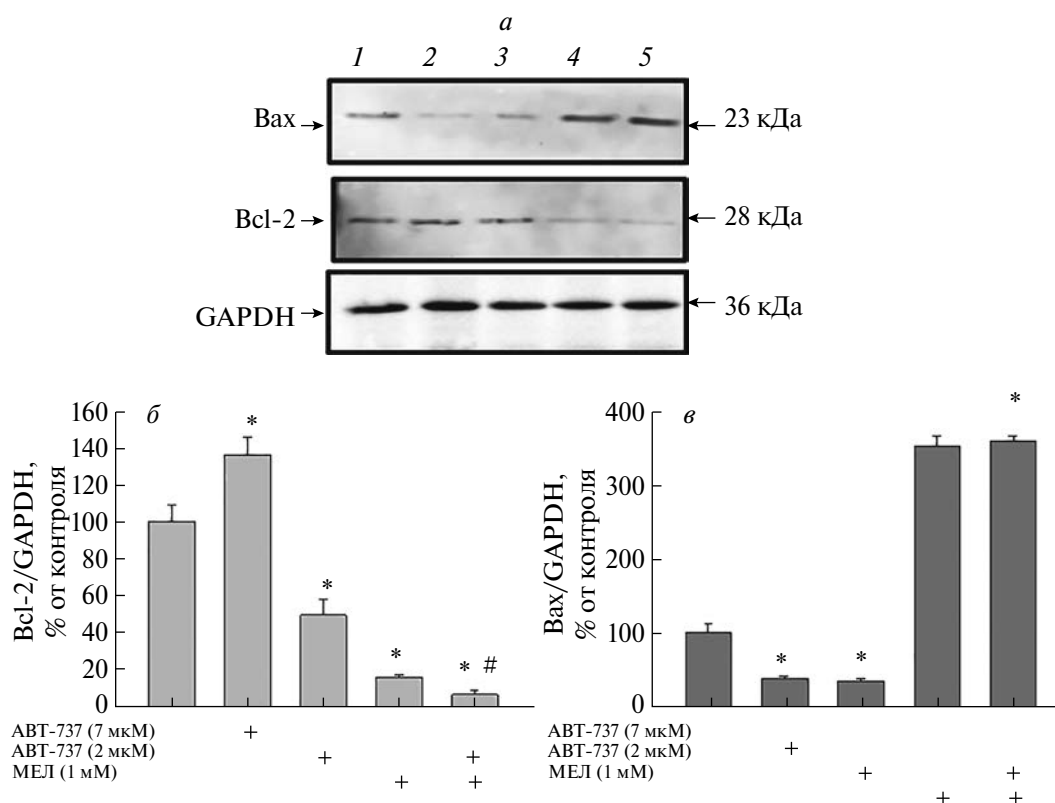
Известно, что МЕЛ не проявляет токсичности в здоровых клетках человека и способен повышать жизнеспособность нейтрофилов и лимфоцитов в присутствии 500 мкМ  $H_2O_2$  [33], поэтому мы исследовали влияние только МЕЛ и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 на жизнеспособность здоровых клеток человека – моноцитов (рис. 3). Из рис. 3 видно, что ни МЕЛ, ни комбинация МЕЛ с АВТ-737 в низкой концентрации, добавляемые к моноцитам, не приводили к изменению жизнеспособности клеток, что говорит об отсутствии цитотоксического действия как МЕЛ, так и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 на здоровые клетки.

Известно, что повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий приводит к индукции апоптоза, и существенную роль в этом играют белки семейства Bcl-2, которые, связываясь с Вах/Вак, поддерживают целостность митохондриальной мембраны и предотвращают апоптоз [34]. В опухолевых клетках нарушена регуляция белков семейства Bcl-2, повышенное содержание этих белков приводит к тому, что клетки становятся устойчивыми к апоптозу [34]. Более того, АВТ-737 способствует гибели клеток после обработки агентами, индуцирующими проапоптотические сигналы



**Рис. 3.** Влияние МЕЛ на жизнеспособность моноцитов человека. Клетки инкубировали с МЕЛ в течение 24 ч. Количество живых клеток в интактной культуре (контроль, без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 6$ ).

[5]. В настоящем исследовании мы проверили содержание Bcl-2 и Вах в условиях нашего эксперимента (рис. 4). На рис. 4а приведены Вестерн-блоты, окрашенные антителами к Bcl-2 и Вах. GAPDH использовали для контроля белковой нагрузки. На рис. 4б, в показаны количественные изменения в содержании белков, представленные как соотношение оптической плотности белков и GAPDH. Под действием АВТ-737 (7 мкМ) содержание Bcl-2 увеличивалось на 38%, а Вах снижалось на 60% по сравнению с контролем (столбец 2 vs. 1), тогда как АВТ-737 в концентрации 2 мкМ снижал уровень Bcl-2 и Вах на 55 и 65% соответственно (столбец 3 vs. 1). МЕЛ снижал уровень Bcl-2 на 84% и повышал уровень Вах в 3.5 раза (столбец 4 vs. 1). Совместное воздействие МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) приводило к снижению содержания



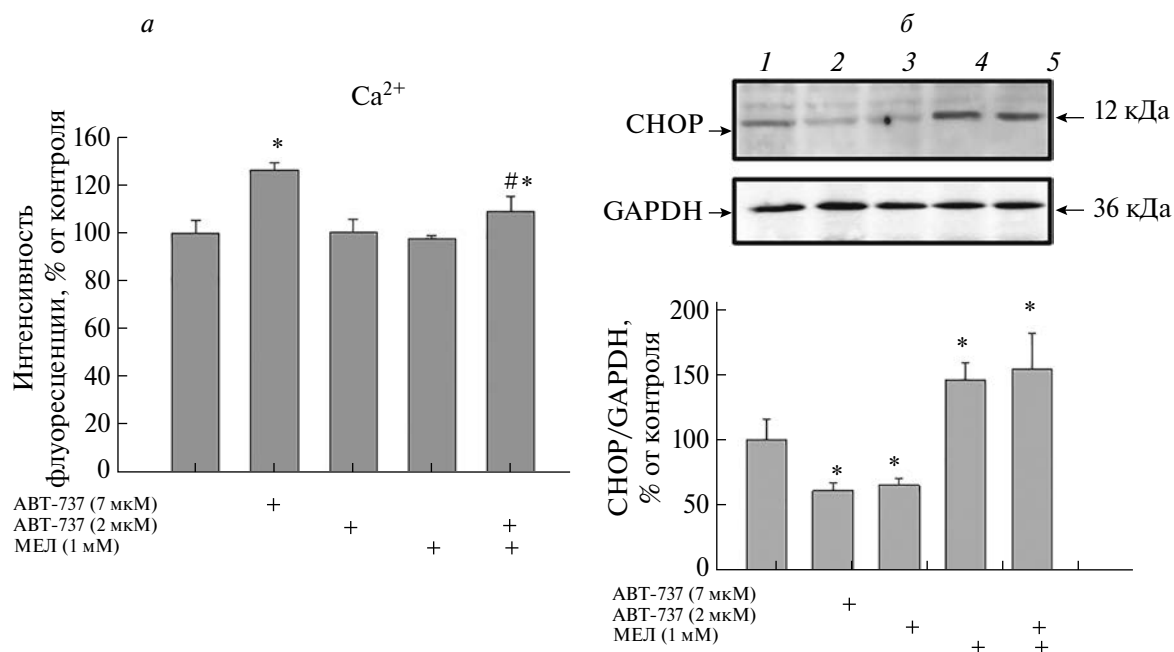
**Рис. 4.** Влияние МЕЛ и его комбинации с АВТ-737 на содержание белков Bcl-2 и Bax в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Иммуноокрашивание антителами к Bcl-2 и Bax. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. *б* – Диаграмма соотношения Bcl-2/GAPDH. *в* – Диаграмма соотношения Bax/GAPDH. В качестве контроля использовали уровень белка в клеточном лизате без добавок (100%). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  – Значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

Bcl-2 на 95% и к повышению содержания Bax в 3.5 раза (столбец 5 vs. 1). Комбинация МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) снижала содержание Bcl-2 на 55% (по сравнению с действием одного МЕЛ), но содержание Bax не изменялось (столбец 5 vs. 4).

Изменение проницаемости внутренней мембраны митохондрий может приводить к формированию поры неспецифической проницаемости (мРТР) со снижением мембранного потенциала, увеличением продукции АФК и выходу  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль [35]. По этой причине мы изучили влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 5), а поскольку в освобождении  $\text{Ca}^{2+}$  участвует белок СНОР, гомологичный С/ЕВР, мы оценили также изменение содержания СНОР в клетках. При добавлении АВТ-737 (7 мкМ) к клеткам ТНР-1 содержание цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 5а) в них увеличивалось на 20% (столбец 2 vs. 1). Мы не заметили каких-либо изменений в клетках ТНР-1 в присутствии АВТ-737 (2 мкМ) (столбец 3 vs. 1), обработка клеток МЕЛ также не привела к значимому эффекту (столбец 4 vs.

1). Однако при совместном добавлении АВТ-737 (2 мкМ) и МЕЛ содержание цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках повышалось на 12% по сравнению с контролем (столбец 5 vs. 1) и на 15% относительно одного МЕЛ (столбец 5 vs. 4). В присутствии АВТ-737 (7 и 2 мкМ) содержание СНОР в клетках ТНР-1 снижалось на 40% (столбцы 2 и 3 vs. 1), тогда как МЕЛ повышал уровень СНОР на 45% относительно контроля (столбец 4 vs. 1). Совместное действие АВТ-737 (2 мкМ) с МЕЛ приводило к увеличению содержания СНОР на 50% относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и в 2 раза по сравнению с одним только АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

Ранее на клетках HL-60, служащих моделью ОПЛ, мы показали, что МЕЛ в комбинации с АВТ-737 в сниженной концентрации вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, увеличивая падение мембранного потенциала, что приводит к повышению продукции АФК с последующим усилением аутофагии [21]. В настоящей работе нами изучено изменение  $\Delta\psi_m$ , продукции АФК и содержания таких маркеров аутофагии, как LC3A/B – I (16 кДа) и LC3A/B – II (14 кДа) в присутствии АВТ-737 и МЕЛ

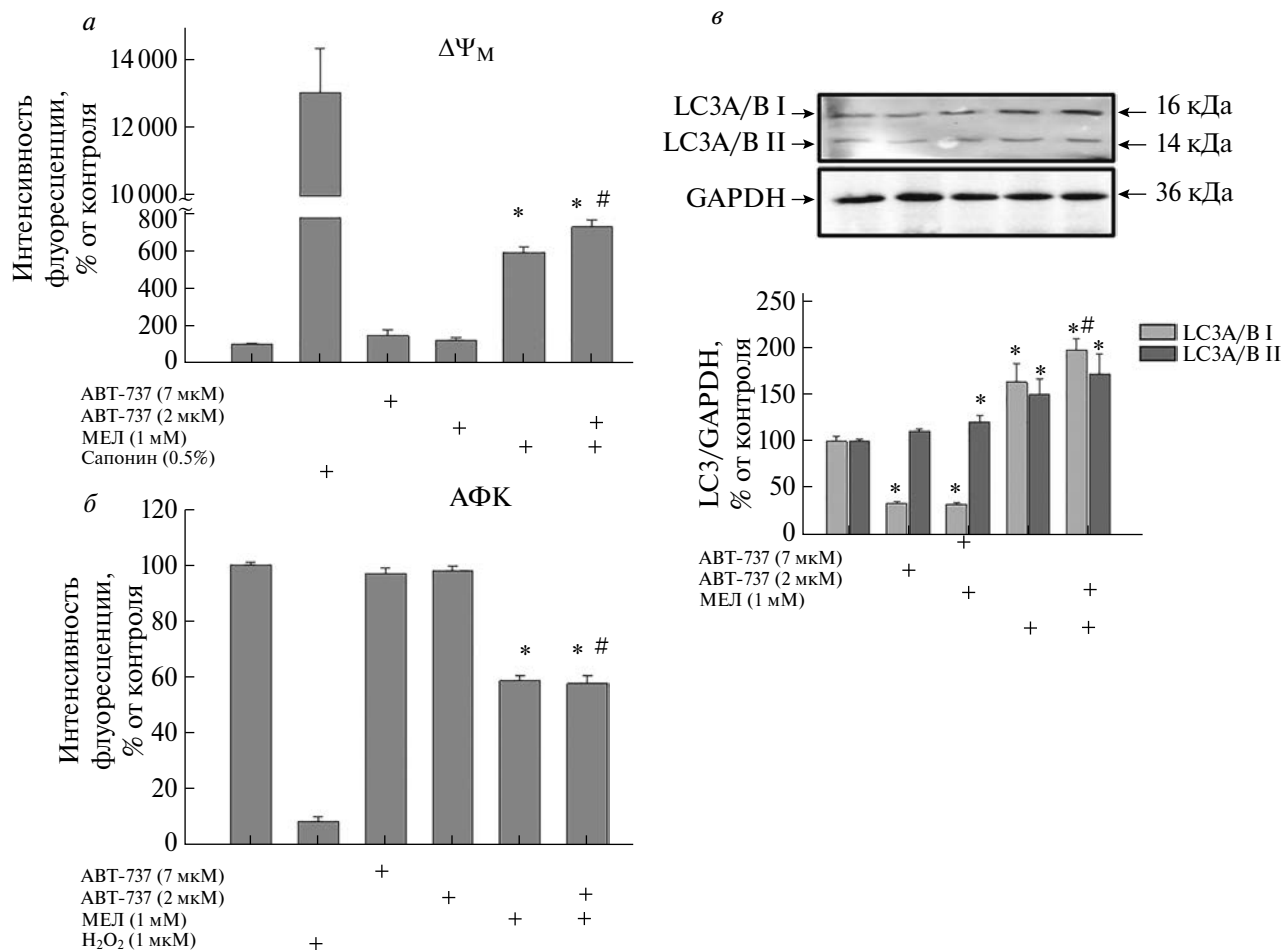


**Рис. 5.** Влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и содержания СНОР в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Изменение содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Интенсивность флуоресценции интактных клеток использовали в качестве контроля, данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 5$ ). *б* – Иммуноокрашивание антителами к СНОР, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с соответствующим контролем, # $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

в клетках ТНР-1, служащих моделью ОМоЛ (рис. 6). В качестве положительного контроля использовали 0.5%-ный сапонин. Из рис. 6 видно, что АВТ-737 (7 и 2 мкМ) не изменял  $\Delta\Psi_m$  по сравнению с контролем (столбцы 3 и 4 vs. 1). Добавление МЕЛ к клеткам приводило к снижению  $\Delta\Psi_m$  на 45% (столбец 5 vs. 1). Совместное действие МЕЛ и АВТ-737 приводило к снижению  $\Delta\Psi_m$  на 47% относительно контроля (столбец 6 vs. 1) и на столько же относительно АВТ-737 (столбец 6 vs. 4). На рис. 6б показано изменение продукции АФК в наших условиях.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. АВТ-737 (7 и 2 мкМ) не влиял на уровень АФК по сравнению с контролем (столбцы 3 и 4 vs. 1). Добавление МЕЛ приводило к повышению продукции АФК в 7 раз (столбец 5 vs. 1), тогда как при совместном применении МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) продукция АФК возрастала в 9 раз по сравнению с контролем (столбец 6 vs. 1) и в 6 раз по сравнению с АВТ-737 (столбец 6 vs. 4).

Аутофагия представляет собой многоэтапный процесс самодеградаций клеточных компонентов, при котором белки и органеллы секвестрируются и модифицируются внутри аутофagosом, а затем переносятся в лизосомы [25]. МЕЛ может регулировать аутофагию, мо-

дулируя ее активность, улучшая пути протеолиза либо предотвращая митохондриальную дисфункцию из-за снижения окислительного стресса, либо повышая эффективность ЭПР, что приводит к снижению количества неправильно свернутых белков [36]. Нами изучено изменение уровней LC3A/B (I, II) в клетках ТНР-1. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. На рис. 6в (в верхней части) показан Вестерн-блот, окрашенный антителами LC3A/B (I, II). В нижней части рис. 6в представлены данные количественного изменения в содержании белков и соотношении белков к GAPDH. В присутствии АВТ-737 (7 и 2 мкМ) содержание LC3A/B-I в клетках ТНР-1 в обоих случаях снижалось на 70%, в то время как экспрессия LC3A/B-II возрастала на 10 и 20% соответственно (столбцы 2 и 3 vs. 1). МЕЛ повышал уровень LC3A/B-I и LC3A/B-II на 70 и 50% соответственно, по сравнению с контролем (столбец 4 vs. 1). Совместное воздействие АВТ-737 (2 мкМ) и МЕЛ приводило к увеличению содержания LC3A/B-I и LC3A/B-II в 2 раза и на 85% соответственно, относительно контроля (столбец 5 vs. 1). Обработка МЕЛ и АВТ-737 увеличивала содержание LC3A/B-I в 5 раз, а LC3A/B-II на 40% по сравнению с одним только АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).



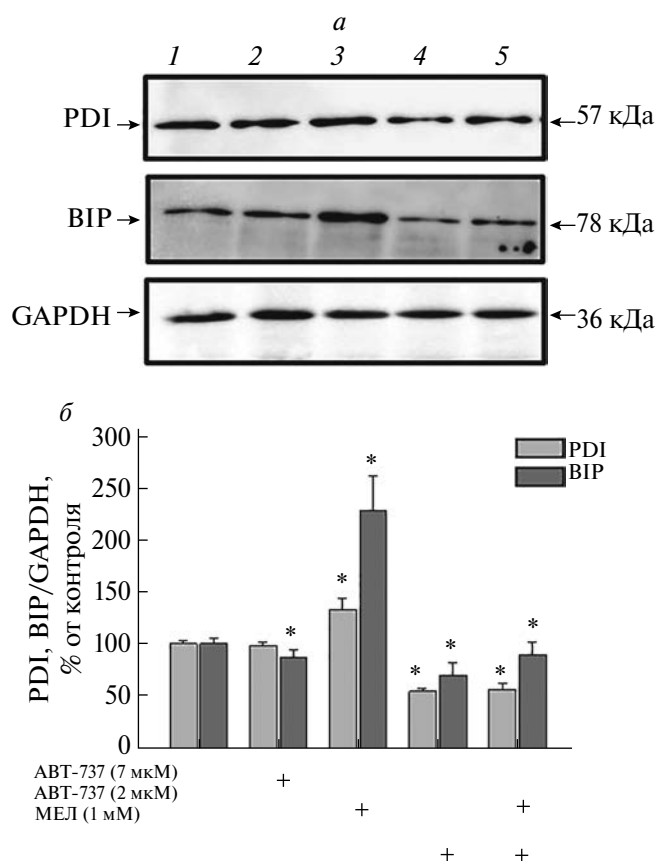
**Рис. 6.** Влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение  $\Delta\Psi_M$ , внутриклеточной продукции АФК и маркеров аутофагии (LC3A/B-I/II) в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Изменение  $\Delta\Psi_M$  в клетках ТНР-1. *б* – Изменение внутриклеточной продукции АФК; данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 6$ ). *в* – Иммуноокрашивание антителами к LC3A/B-I/II, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с соответствующим контролем, # $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

Поскольку ЭПР участвует в таких клеточных функциях, как кальциевый гомеостаз, синтез белков или фосфолипидов, а ЭПР-стресс способен инициировать аутофагию [37, 38], мы проверили изменение содержания белков VIP и PDI в наших экспериментальных условиях (рис. 7). В верхней части рис. 7 приведены Вестерн-блоты, окрашенные антителами, в нижней части – количественное изменение содержания белков, измеренное по соотношению оптической плотности белков и GAPDH. Из рис. 7 видно, что уровни VIP и PDI не изменялись при добавлении АВТ-737 (7 мкМ) (столбец 2 vs. 1), в то время как АВТ-737 в концентрации 2 мкМ увеличивал содержание VIP в 2 раза, а PDI на 25% (столбец 3 vs. 1). МЕЛ снижал содержание VIP и PDI на 35 и 50% соответственно (столбец 4 vs. 1). Совместное действие МЕЛ с АВТ-737 (2 мкМ) приводило к снижению уровней

VIP и PDI на 20 и 50% относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и на 70% для VIP и 60% для PDI по сравнению с АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимосвязь между МЕЛ и онкологическими заболеваниями изучают в течение последних 80 лет. Противоопухолевая активность этого гормона подтверждается результатами многочисленных исследований. Так, показаны антипролиферативные, антимиграционные и проапоптотические эффекты МЕЛ в сочетании с 5-фторурацилом в клетках рака толстой кишки (линии SW620 и LOVO) [18]. МЕЛ ингибировал также пролиферацию опухолевых стволовых клеток, выделенных из клеток CSC рака яичников [39], подавлял рост клеток MDA-



**Рис. 7.** Влияние МЕЛ и его комбинации с АВТ-737 на содержание VIP и PDI в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Иммуноокрашивание антителами к VIP и PDI, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. *б* – Диаграмма, отражающая соотношение VIP к GAPDH. *в* – Диаграмма, отражающая соотношение PDI к GAPDH. Уровень белка в клеточном лизате без каких-либо добавок служил контролем (100%). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$  – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

МВ-231 рака молочной железы как *in vitro*, так и *in vivo* [40], а также пролиферацию клеток MG-63 остеосаркомы человека [41]. Согласно полученным нами результатам, МЕЛ подавлял пролиферативную и митотическую активность клеток ТНР-1 ОМол. Следует отметить, что эффект подавления усиливался при применении комбинации МЕЛ и АВТ-737 в сниженной концентрации.

Противоопухолевое действие МЕЛ, как показано в ряде работ, имеет дозозависимый эффект. Для лечения различных типов рака необходимы относительно высокие концентрации МЕЛ как *in vitro* (0.1–10.0 мМ), так и *in vivo* (5–200 мг/кг) [7, 42, 43]. Высокие дозы МЕЛ требуются для достижения фармакологическо-

го эффекта. Нами показано, что использование МЕЛ в достаточно высокой концентрации не приводило к изменению жизнеспособности моноцитов (рис. 3).

Известно, что, когда ЭПР-стресс становится необратимым и нормальная функция ЭПР не может быть восстановлена, инициируется апоптоз, который в итоге приводит к гибели клетки. Апоптоз, вызванный ЭПР-стрессом, включает экспрессию/активацию проапоптотических молекул, в том числе СНОР, который регулирует про- и антиапоптотические белки, такие как белки семейства Bcl-2 (BclxL, Bclw и Mcl-1) и ВАК, Вах [44, 45]. Мы исследовали изменение содержания апоптотических белков Bcl-2 и Вах и наблюдали, что и сам МЕЛ, и МЕЛ совместно с АВТ-737 снижали экспрессию Bcl-2 и повышали содержание Вах (рис. 4). Кроме того, мы наблюдали повышение уровня СНОР в присутствии одного МЕЛ или МЕЛ в комбинации с АВТ-737 (рис. 5б). Предполагается, что и сам МЕЛ, и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 в низкой концентрации активируют СНОР-опосредованный сигнальный каскад, что приводит к изменению содержания апоптотических белков Вах и Bcl-2. Полученные результаты соответствуют данным, согласно которым МЕЛ инициирует апоптоз за счет усиления активности каспаз-3, -8 и -9, изменения соотношения Вах/Bcl-2, расщепления PARP и повышения содержания белков цитохрома *c*, p53 и Fas-L при гепатоцеллюлярной карциноме, причем этот эффект опосредован повышением ЭПР-стресса, характеризующегося повышенной регуляцией ATF6 и СНОР [46].

Известно, что апоптоз, вызванный ЭПР-стрессом, включает активацию рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R) и высвобождение  $Ca^{2+}$  через оксидоредуктин-1 $\alpha$  (ERO1- $\alpha$ ), индуцированный СНОР [47]. Кроме того, на изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле активно реагируют различные органеллы клетки, в первую очередь митохондрии [48]. МЕЛ и его совместное применение с АВТ-737 повышали содержание цитозольного  $Ca^{2+}$  (рис. 5а). Поступление сверхпорогового  $Ca^{2+}$  в митохондриальный матрикс может привести к падению мембранного потенциала митохондрий и развитию окислительного стресса [49, 50]. Более того, накопление  $Ca^{2+}$  в митохондриях может сопровождаться повышением продукции АФК [51, 52]. Мы наблюдали, что применение МЕЛ и МЕЛ + АВТ-737 приводило к снижению мембранного потенциала и повышению внутриклеточной продукции АФК (рис. 6а, б). Накопленные данные показывают, что ЭПР-стресс может запускать аутофагию [26]. Кроме того, известно, что аутофагия может участвовать в гибели

клеток под влиянием различных стимулов или стресса [53], а МЕЛ может принимать участие в регуляции аутофагии [36], тогда как СНОР является прямым регулятором многочисленных генов, участвующих в процессе аутофагии [54, 55]. В настоящем исследовании нами показано повышение экспрессии маркеров аутофагии под действием МЕЛ и комбинации МЕЛ + АВТ-737 (рис. 6*б*).

Во многих видах опухолей содержание ВІР повышается, защищая опухолевые клетки от стресс-индуцированного апоптоза [56], а увеличенная экспрессия РDІ активно участвует в пролиферации, выживании и метастазировании некоторых типов опухолевых клеток [57]. При этом ЭПР-стресс активирует сигнальный путь, индуцирующий транскрипционный фактор СНОР, связанный с апоптозом, который активируется в сигнальном пути PERK-ATF4-СНОР [58]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что как сам МЕЛ, так и совместно с АВТ-737 в низких дозах вызывают ЭПР-зависимый стресс в клетках ОМол и запускают сигнальный путь активации проапоптотического фактора СНОР, при этом уровни шаперонов ВІР и РDІ снижаются (рис. 7), что способствует ослаблению защиты клеток ОМол от стресс-индуцированного апоптоза.

Предполагается, что механизм действия МЕЛ связан с СНОР-опосредованным повышением уровня цитозольного  $Ca^{2+}$ , который приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и повышению внутриклеточной продукции АФК, а активация СНОР стимулирует при этом аутофагию. Эти результаты согласуются с данными о связи СНОР с апоптозом посредством модуляции соотношения проапоптотических и антиапоптотических белков и его участия в высвобождении  $Ca^{2+}$  из ЭПР [47, 59]. Действие МЕЛ и его совместное применение с АВТ-737 приводит к снижению содержания Bcl-2 и увеличению Вах, что, в свою очередь, предполагает запуск апоптотического каскада. В этих условиях активация СНОР модулирует аутофагию, повышая содержание маркеров LC3A/B-I, II, в то время как снижение содержания шаперонов ВІР и РDІ “снимает” защиту клеток ТНР-1 от индукции апоптоза. Исходя из рассмотренных данных и результатов, полученных ранее на клетках HL-60 и MV4-11, можно заключить, что совместное использование МЕЛ со сниженными дозами химиотерапевтических препаратов представляется перспективным в терапии лейкозов.

Работа выполнена в рамках госзадания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (№ 075-01025-23-00).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Процедуры также были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, протокол № 13/2023 от 8 февраля 2023 года. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M. (2016) Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* **6**, e441.
2. Fernandez H.F., Sun Z., Yao X., Litzow M.R., Luger S.M., Paietta E.M., Racevskis J., Dewald G.W., Ketterling R.P., Bennett J.M., Rowe J.M., Lazarus H.M., Tallman M.S. (2009) Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1249–1259.
3. Coombs C.C., Tavakkoli M., Tallman M.S. (2015) Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J.* **5**, e304.
4. Guerra V.A., DiNardo C., Konopleva M. (2019) Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **32**, 145–153.
5. Oltersdorf T., Elmore S.W., Shoemaker A.R., Armstrong R.C., Augeri D.J., Belli B.A., Bruncko M., Deckwerth T.L., Dinges J., Hajduk P.J., Joseph M.K., Kitada S., Korsmeyer S.J., Kunzer A.R., Letai A., Li C., Mitten M.J., Nettesheim D.G., Ng S., Nimmer P.M., O'Connor J.M., Oleksijew A., Petros A.M., Reed J.C., Shen W., Tahir S.K., Thompson C.B., Tomaselli K.J., Wang B., Wendt M.D., Zhang H., Fesik S.W., Rosenberg S.H. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* **435**, 677–681.
6. Matthews J.P., Bishop J.F., Young G.A., Juneja S.K., Lowenthal R.M., Garson O.M., Cobcroft R.G., Dodds A.J., Enno A., Gillett E.A., Hermann R.P., Joshua D.E., Ma D.D., Szer J., Taylor K.M., Wolf M., Bradstock K.F., Australian Leukemia Study G. (2001) Patterns of failure with increasing intensification of induction chemotherapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **113**, 727–736.
7. Menendez-Pelaez A., Reiter R.J. (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal. Res.* **15**, 59–69.
8. Pourhanifteh M.H., Mahdavinia M., Reiter R.J., Asemi Z. (2019) Potential use of melatonin in skin can-

- cer treatment: a review of current biological evidence. *J. Cell. Physiol.* **234**, 12142–12148.
9. Pourhanifeh M.H., Mehrzadi S., Kamali M., Hosseinzadeh A. (2020) Melatonin and gastrointestinal cancers: current evidence based on underlying signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **886**, 173471.
  10. Wang J., Xiao X., Zhang Y., Shi D., Chen W., Fu L., Liu L., Xie F., Kang T., Huang W., Deng W. (2012) Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal. Res.* **53**, 77–90.
  11. Anderson G. (2020) The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma: melatonin and glioblastoma: pathophysiology and treatment. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **34**, 189–191.
  12. Buyukavci M., Ozdemir O., Buck S., Stout M., Ravindranath Y., Savasan S. (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **20**, 73–79.
  13. Bejarano I., Redondo P.C., Espino J., Rosado J.A., Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., Rodriguez A.B. (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J. Pineal. Res.* **46**, 392–400.
  14. Shafabakhsh R., Mirzaei H., Asemi Z. (2020) Melatonin: a promising agent targeting leukemia. *J. Cell Biochem.* **121**, 2730–2738.
  15. Plaimee P., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Johns N.P. (2015) Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* **48**, 67–77.
  16. Yi C., Zhang Y., Yu Z., Xiao Y., Wang J., Qiu H., Yu W., Tang R., Yuan Y., Guo W., Deng W. (2014) Melatonin enhances the anti-tumor effect of fisetin by inhibiting COX-2/iNOS and NF-kappaB/p300 signaling pathways. *PLoS One.* **9**, e99943.
  17. Shen Y.Q., Guerra-Librero A., Fernandez-Gil B.I., Florido J., Garcia-Lopez S., Martinez-Ruiz L., Mendivil-Perez M., Soto-Mercado V., Acuna-Castroviejo D., Ortega-Arellano H., Carriel V., Diaz-Casado M.E., Reiter R.J., Rusanova I., Nieto A., Lopez L.C., Escames G. (2018) Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J. Pineal. Res.* **64**(3). doi: 10.1111/jpi.12461
  18. Gao Y., Xiao X., Zhang C., Yu W., Guo W., Zhang Z., Li Z., Feng X., Hao J., Zhang K., Xiao B., Chen M., Huang W., Xiong S., Wu X., Deng W. (2017) Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF-kappaB/iNOS signaling pathways. *J. Pineal. Res.* **62**(2). doi: 10.1111/jpi.12380
  19. Baburina Y., Lomovsky A., Krestinina O. (2021) Melatonin as a potential multitherapeutic agent. *J. Pers. Med.* **11**(4), 274.
  20. Krestinina O., Fadeev R., Lomovsky A., Baburina Y., Kobyakova M., Akatov V. (2018) Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in HL-60 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2873.
  21. Lomovsky A., Baburina Y., Odinkova I., Kobyakova M., Evstratova Y., Sotnikova L., Krestinin R., Krestinina O. (2020) Melatonin can modulate the effect of navitoclax (AVT-737) in HL-60 cells. *Antioxidants* (Basel). **9**(11), 1143.
  22. Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Фадеев Р.С., Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В. (2023) Мелатонин может усиливать действие препаратов, применяемых при лечении лейкемии. *Биохимия.* **88**, 110–124.
  23. Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Кобякова М.И., Фадеев Р.С., Акатов В.С., Крестинина О.В. (2020) Мелатонин усиливает химиотерапевтическое действие цитарабина в клетках HL-60. *Биол. Мембраны.* **37**, 103–109.
  24. Zeeshan H.M., Lee G.H., Kim H.R., Chae H.J. (2016) Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 327.
  25. Huber T.B., Walz G., Kuehn E.W. (2011) mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney Int.* **79**, 502–511.
  26. Cybulsky A.V. (2013) The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* **84**, 25–33.
  27. Yuzefovych L.V., LeDoux S.P., Wilson G.L., Rachek L.I. (2013) Mitochondrial DNA damage via augmented oxidative stress regulates endoplasmic reticulum stress and autophagy: crosstalk, links and signaling. *PLoS One.* **8**, e83349.
  28. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* **26**, 171–176.
  29. Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 555–561.
  30. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* **5**, e8668.
  31. Mediavilla M.D., Cos S., Sanchez-Barcelo E.J. (1999) Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life Sci.* **65**, 415–420.
  32. Fornas O., Mato M.E., Webb S.M. (2000) Antiproliferative effect and cell cycle modulation by melatonin on GH(3) cells. *Horm. Res.* **53**, 251–255.
  33. Bejarano I., Espino J., Marchena A.M., Barriga C., Paredes S.D., Rodriguez A.B., Pariente J.A. (2011) Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **353**, 167–176.



34. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 49–63.
35. Bonora M., Pinton P. (2014) The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front. Oncol.* **4**, 302.
36. Boga J.A., Caballero B., Potes Y., Perez-Martinez Z., Reiter R.J., Vega-Naredo I., Coto-Montes A. (2019) Therapeutic potential of melatonin related to its role as an autophagy regulator: a review. *J. Pineal. Res.* **66**, e12534.
37. Kato H., Nishitoh H. (2015) Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. *Front. Oncol.* **5**, 93.
38. Yorimitsu T., Nair U., Yang Z., Klionsky D.J. (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30299–30304.
39. Akbarzadeh M., Movassaghpour A.A., Ghanbari H., Kheirandish M., Fathi Maroufi N., Rahbarghazi R., Nouri M., Samadi N. (2017) The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. *Sci. Rep.* **7**, 17062.
40. Sonehara N.M., Lacerda J.Z., Jardim-Perassi B.V., de Paula Jr R., Jr., Moschetta-Pinheiro M.G., Souza Y.S.T., de Andrade J.C.J., De Campos Zuccari D.A.P. (2019) Melatonin regulates tumor aggressiveness under acidosis condition in breast cancer cell lines. *Oncol. Lett.* **17**, 1635–1645.
41. Liu L., Xu Y., Reiter R.J. (2013) Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone.* **55**, 432–438.
42. Wang L., Wang C., Choi W.S. (2022) Use of melatonin in cancer treatment: where are we? *Int. J. Mol. Sci.* **23**(7), 3779.
43. Wang X., Wang B., Zhan W., Kang L., Zhang S., Chen C., Hou D., You R., Huang H. (2019) Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.* **117**, 109018.
44. Tsukano H., Gotoh T., Endo M., Miyata K., Tazume H., Kadomatsu T., Yano M., Iwawaki T., Kohno K., Araki K., Mizuta H., Oike Y. (2010) The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1925–1932.
45. Iurlaro R., Munoz-Pinedo C. (2016) Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* **283**, 2640–2652.
46. Dhillon S. (2018) Ivosidenib: first global approval. *Drugs.* **78**, 1509–1516.
47. Li G., Mongillo M., Chin K.T., Harding H., Ron D., Marks A.R., Tabas I. (2009) Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* **186**, 783–792.
48. Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., Rizzuto R. (2008) Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* **8**, 119–130.
49. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., Rizzuto R. (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* **27**, 6407–6418.
50. Kruman I., Guo Q., Mattson M.P. (1998) Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **51**, 293–308.
51. Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 333–343.
52. Maciel E.N., Vercesi A.E., Castilho R.F. (2001) Oxidative stress in Ca<sup>2+</sup>-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J. Neurochem.* **79**, 1237–1245.
53. Kim K.W., Moretti L., Mitchell L.R., Jung D.K., Lu B. (2010) Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by Perk-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene.* **29**, 3241–3251.
54. Rouschop K.M., van den Beucken T., Dubois L., Niessen H., Bussink J., Savelkoul K., Keulers T., Mujcic H., Landuyt W., Voncken J.W., Lambin P., van der Kogel A.J., Koritzinsky M., Wouters B.G. (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes *MAP1LC3B* and *ATG5*. *J. Clin. Invest.* **120**, 127–141.
55. Ubeda M., Wang X.Z., Zinszner H., Wu I., Habener J.F., Ron D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell Biol.* **1**, 1479–1489.
56. Kosakowska-Cholody T., Lin J., Srideshikan S.M., Scheffer L., Tarasova N.I., Acharya J.K. (2014) HKH40A downregulates GRP78/BiP expression in cancer cells. *Cell Death Dis.* **5**, e1240.
57. Lee E., Lee D.H. (2017) Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. *BMB Rep.* **50**, 401–410.
58. Nishitoh H. (2012) CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* **151**, 217–219.
59. Fernandez A., Ordonez R., Reiter R.J., Gonzalez-Gallego J., Mauriz J.L. (2015) Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J. Pineal. Res.* **59**, 292–307.

## Melatonin Enhances the Effect of ABT-737 in Acute Monocytic Leukemia THP-1 Cells

A. I. Lomovsky<sup>1</sup>, Yu. L. Baburina<sup>1</sup>, R. S. Fadeev<sup>1</sup>, M. I. Kobyakova<sup>1, 2</sup>,  
Ya. V. Lomovskaya<sup>1</sup>, R. R. Krestinin<sup>1</sup>, L. D. Sotnikova<sup>1</sup>, and O. V. Krestinina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

<sup>2</sup> *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia*

\*e-mail: ovkres@mail.ru

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MEL) is a hormone synthesized by the pineal gland. Due to its oncostatic effect, it can be considered as an antitumor agent and used for combination therapy. ABT-737, a Bcl-2 inhibitor, promotes cell death after treatment with agents that induce pro-apoptotic signals. In the present study, the combined effect of MEL and ABT-737 on changes in proliferative and mitotic activity, mitochondrial membrane potential, intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and cytosolic Ca<sup>2+</sup> was studied. Moreover, changes in the expression of anti- and pro-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bax), autophagy markers (LC3A/B (I, II)), endoplasmic reticulum stress markers (chaperones BIP and PDI, CHOP) were studied under these conditions. The effect of MEL together with ABT-737 led to an increase in the level of cytosolic Ca<sup>2+</sup>, intracellular production of ROS, and a decrease in the membrane potential of mitochondria. Under these conditions, the content of Bcl-2 increased, while the level of Bax decreased. The activation of CHOP stimulated autophagy and led to a decrease in the expression of BIP and PDI chaperones. These results suggest that MEL is able to enhance the effects of other chemotherapeutic agents and can be used in strategies in the treatment of cancer.

**Keywords:** acute monocytic leukemia, THP-1, melatonin (MEL), ABT-737, autophagy, ER-stress

УДК 578.264.2:57.083.224

## НИЗКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ВИРУСНЫХ микроРНК В МАКРОФАГАХ И НЕЗРЕЛЫХ В-КЛЕТКАХ ПРИ ЛАТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ ГИГРОМИЦИНУСТОЙЧИВОГО ГАММАГЕРПЕСВИРУСА-68 МЫШИ<sup>#</sup>

© 2024 г. М. Кара<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Bursa Uludag University, Bursa, 16059 Turkey

<sup>b</sup> Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 3261 USA

\*e-mail: mehmetkara@uludag.edu.tr

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к печати 26.07.2023 г.

Гаммагерпесвирус-68 мыши (murine gammaherpesvirus 68, MHV68) латентно инфицирует главным образом В-клетки и вызывает у лабораторных мышей лимфому, напоминающую по симптоматике гаммагерпесвирусные заболевания человека. Для изучения молекулярного механизма вирусной инфекции и того, как вирусные детерминанты контролируют клетку и в итоге вызывают онкогенез, необходимы легкодоступные латентно инфицированные клеточные линии. Для *in vitro* исследования латентности MHV68, как и других гаммагерпесвирусов, доступны только две системы культивирования: созревающие В-клетки и макрофаги. В связи с этим актуальна задача расширения репертуара клеточных линий, латентно инфицированных MHV68. В проведенном исследовании получено несколько клонов линий незрелых В-клеток и макрофагоподобных клеток с латентным фенотипом. Устойчивый к гигромицину рекомбинантный вирус MHV68 был выделен из лабораторной линии латентно инфицированных клеток HE2.1 и размножен под селекцией гигромицина для получения стабильных клеточных линий, несущих вирусный геном. В субклонах этих клеточных линий анализировали экспрессию вирусных микроРНК с помощью количественной ПЦР TaqMan и оценивали экспрессию литического вирусного транскрипта МЗ. Клеточные линии сохраняли вирусный геном в виде эписомы, что показано с помощью ПЦР-анализа с расщеплением-циркуляризацией. Несмотря на то что полученные латентно инфицированные клеточные линии экспрессировали вирусные микроРНК на уровнях, не превышающих таковые в родительской клеточной линии, их можно рассматривать как альтернативный инструмент для изучения механизмов латентности и идентификации мишеней микроРНК.

**Ключевые слова:** MHV68, мышинный гаммагерпесвирус 68, латентная стадия, клеточная линия, вирусные микроРНК, ПЦР с расщеплением-циркуляризацией

**DOI:** 10.31857/S0026898424010148, **EDN:** NVDCRY

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thorley-Lawson D.A., Gross A. (2004) Persistence of the Epstein–Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1328–1337.
2. Miller G. (1982) Immortalization of human lymphocytes by Epstein–Barr virus. *Yale J. Biol. Med.* **55**, 305–310.
3. Bechtel J.T., Liang Y., Hvidding J., Ganem D. (2003) Host range of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J. Virol.* **77**, 6474–6481.
4. Coleman C.B., Nealy M.S., Tibbetts S.A. (2010) Immature and transitional B cells are latency reservoirs for a gammaherpesvirus. *J. Virol.* **84**, 13045–13052.
5. Hwang S., Wu T.-T., Tong L.M., Kim K.S., Martinez-Guzman D., Colantonio A.D., Uittenboogaart C.H., Sun R. (2008) Persistent gammaherpesvirus replication and dynamic interaction with the host *in vivo*. *J. Virol.* **82**, 12498–12509.
6. Usherwood E.J., Stewart J.P., Nash A.A. (1996) Characterization of tumor cell lines derived from murine gammaherpesvirus-68-infected mice. *J. Virol.* **70**, 6516–6518.
7. Forrest J.C., Speck S.H. (2008) Establishment of B-cell lines latently infected with reactivation-competent murine gammaherpesvirus 68 provides evidence for viral alteration of a DNA damage-signaling cascade. *J. Virol.* **82**, 7688–7699.

<sup>#</sup>Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

8. Barton E., Mandal P., Speck S.H. (2011) Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 351–397.
9. Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **136**, 215–233.
10. Kincaid R.P., Sullivan C.S. (2012) Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. *PLoS Pathog.* **8**, e1003018.
11. Cai X., Schäfer A., Lu S., Bilello J.P., Desrosiers R.C., Edwards R., Raab-Traub N., Cullen B.R. (2006) Epstein–Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* **2**, e23.
12. Haecker I., Gay L.A., Yang Y., Hu J., Morse A.M., McIntyre L.M., Renne R. (2012) Ago HITS-CLIP expands understanding of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus miRNA function in primary effusion lymphomas. *PLoS Pathog.* **8**, e1002884.
13. Ramalingam D., Kieffer-Kwon P., Ziegelbauer J.M. (2012) Emerging themes from EBV and KSHV microRNA targets. *Viruses.* **4**, 1687–1710.
14. Coleman C.B., McGraw J.E., Feldman E.R., Roth A.N., Keyes L.R., Grau K.R., Cochran S.L., Waldschmidt T.J., Liang C., Forrest J.C., Tibbetts S.A. (2014) A gammaherpesvirus Bcl-2 ortholog blocks B cell receptor-mediated apoptosis and promotes the survival of developing B cells in vivo. *PLoS Pathog.* **10**, e1003916.
15. Paden C.R., Forrest J.C., Moorman N.J., Speck S.H. (2010) Murine gammaherpesvirus 68 LANA is essential for virus reactivation from splenocytes but not long-term carriage of viral genome. *J. Virol.* **84**, 7214–7224.
16. Feldman E.R., Kara M., Coleman C.B., Grau K.R., Oko L.M., Krueger B.J., Renne R., van Dyk L.F., Tibbetts S.A. (2014) Virus-encoded microRNAs facilitate gammaherpesvirus latency and pathogenesis in vivo. *MBio.* **5**, e00981–00914.
17. Kara M., Tibbetts S.A. (2021) Empirical validation of overlapping virus lncRNAs and coding transcripts by northern blot. In: *Long Non-Coding RNAs in Cancer. Methods in Molecular Biology*. Ed. Navarro A. New York: Springer US, pp. 243–253.
18. Hasbold J., Klaus G.G. (1990) Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1685–1690.
19. Flaño E., Husain S.M., Sample J.T., Woodland D.L., Blackman M.A. (2000) Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J. Immunol.* **165**, 1074–1081.
20. Weck K.E., Kim S.S., Virgin H.W. I.V., Speck S.H. (1999) Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. *J. Virol.* **73**, 3273–3283.
21. Kim K.J., Kanellopoulos-Langevin C., Merwin R.M., Sachs D.H., Asofsky R. (1979) Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J. Immunol.* **122**, 549–554.
22. Humme S., Reisbach G., Feederle R., Delecluse H.-J., Bousset K., Hammerschmidt W., Schepers A. (2003) The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 10989–10994.
23. Hu J., Garber A.C., Renne R. (2002) The latency-associated nuclear antigen of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J. Virol.* **76**, 11677–11687.
24. Forrest J.C., Paden C.R., Allen R.D., Collins J., Speck S.H. (2007) ORF73-null murine gammaherpesvirus 68 reveals roles for mLANA and p53 in virus replication. *J. Virol.* **81**, 11957–11971.
25. Salinas E., Gupta A., Sifford J.M., Oldenburg D.G., White D.W., Forrest J.C. (2018) Conditional mutagenesis in vivo reveals cell type- and infection stage-specific requirements for LANA in chronic MHV68 infection. *PLoS Pathog.* **14**, e1006865.
26. Henderson A., Ripley S., Heller M., Kieff E. (1983) Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 1987–1991.
27. Bullard W.L., Kara M., Gay L.A., Sethuraman S., Wang Y., Nirmalan S., Esemeli A., Feswick A., Hoffman B.A., Renne R., Tibbetts S.A. (2019) Identification of murine gammaherpesvirus 68 miRNA-mRNA hybrids reveals miRNA target conservation among gammaherpesviruses including host translation and protein modification machinery. *PLoS Pathog.* **15**, e1007843.
28. Gay L.A., Sethuraman S., Thomas M., Turner P.C., Renne R. (2018) Modified cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids (qCLASH) identifies Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus microRNA targets in endothelial cells. *J. Virol.* **92**, e02138-17.
29. Ungerleider N., Bullard W., Kara M., Wang X., Roberts C., Renne R., Tibbetts S., Flemington E.K. (2021) EBV miRNAs are potent effectors of tumor cell transcriptome remodeling in promoting immune escape. *PLoS Pathog.* **17**(5), e1009217.
30. Skalsky R.L., Corcoran D.L., Gottwein E., Frank C.L., Kang D., Hafner M., Nusbaum J.D., Feederle R., Delecluse H.J., Luftig M.A., Tuschl T., Ohler U., Cullen B.R. (2012) The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog.* **8**, e1002484.
31. Feldman E.R., Tibbetts S.A. (2015) Emerging roles of herpesvirus microRNAs during in vivo infection and pathogenesis. *Curr. Pathobiol. Rep.* **3**, 209–217.
32. Simas J.P., Swann D., Bowden R., Efsthathiou S. (1999) Analysis of murine gammaherpesvirus-68 transcription during lytic and latent infection. *J. Gen. Virol.* **80**, 75–82.
33. Kara M., O’Grady T., Feldman E.R., Feswick A., Wang Y., Flemington E.K., Tibbetts S.A. (2019) Gammaherpesvirus readthrough transcription generates a long non-coding RNA that is regulated by antisense miRNAs and correlates with enhanced lytic replication in vivo. *Noncoding RNA.* **5**, 6.
34. Speck S.H., Ganem D. (2010) Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host. Microbe.* **8**, 100–115.

35. Feederle R., Haar J., Bernhardt K., Linnstaedt S.D., Bannert H., Lips H., Cullen B.R., Delecluse H.-J. (2011) The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocyte. *J. Virol.* **85**, 9801–9810.
36. Feederle R., Linnstaedt S.D., Bannert H., Lips H., Bencun M., Cullen B.R., Delecluse H.-J. (2011) A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog.* **7**, e1001294.
37. Gottwein E., Corcoran D.L., Mukherjee N., Skalsky R.L., Hafner M., Nusbaum J.D., Shamlailatpam P., Love C.L., Dave S.S., Tuschl T., Ohler U., Cullen B.R. (2011) Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe.* **10**, 515–526.
38. Boss I.W., Nadeau P.E., Abbott J.R., Yang Y., Merz A., Renne R. (2011) A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ortholog of microRNA miR-155 induces human splenic B-cell expansion in NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null mice. *J. Virol.* **85**, 9877–9886.
39. Moody R., Zhu Y., Huang Y., Cui X., Jones T., Bedolla R., Lei X., Bai Z., Gao S.-J. (2013) KSHV microRNAs mediate cellular transformation and tumorigenesis by redundantly targeting cell growth and survival pathways. *PLoS Pathog.* **9**, e1003857.
40. Preiss N.K., Kang T., Usherwood Y.-K., Huang Y.H., Branchini B.R., Usherwood E.J. (2020) Control of B cell lymphoma by gammaherpesvirus-induced memory CD8 T cells. *J. Immunol.* **205**, 3372–3382.
41. Mrázová V., Betáková T., Kúdelová M., Šupolíková M., Lachová V., Lapuníková B., Golais F. (2015) Murine gammaherpesvirus (MHV-68) transforms cultured cells *in vitro*. *Intervirology.* **58**, 69–72.
42. Mrázová V., Kúdelová M., Smolinská M., Nováková E., Šupolíková M., Vrbová M., Golais F. (2017) Transformation of cells by photoinactivated murine gamma-herpesvirus 68 during nonproductive and quiescent infection. *Intervirology.* **60**, 61–68.
43. Sunil-Chandra N.P., Efstathiou S., Nash A.A. (1993) Interactions of murine gammaherpesvirus 68 with B and T cell lines. *Virology.* **193**, 825–833.
44. Wu T.T., Usherwood E.J., Stewart J.P., Nash A.A., Sun R. (2000) Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency. *J. Virol.* **74**, 3659–3667.
45. Pavlova I.V., Virgin IV H.W., Speck S.H. (2003) Disruption of gammaherpesvirus 68 gene 50 demonstrates that Rta is essential for virus replication. *J. Virology.* **77**, 5731–5739.
46. Adler H., Messerle M., Wagner M., Koszinowski U.H. (2000) Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* **74**, 6964–6974.
47. Jain V., Plaisance-Bonstaff K., Sangani R., Lanier C., Dolce A., Hu J., Brulois K., Haecker I., Turner P., Renne R., Krueger B. (2016) A toolbox for herpesvirus miRNA research: construction of a complete set of KSHV miRNA deletion mutants. *Viruses.* **8**, 54.
48. Wu T.-T., Liao H.-I., Tong L., Leang R.S., Smith G., Sun R. (2010) Construction and characterization of an infectious murine gammaherpesvirus-68 bacterial artificial chromosome. *BioMed. Res. Int.* **2011**, e926258.

## Latent Macrophage and Immature B Cell Lines Generated with Hygromycin-Resistant Murine Gammaherpesvirus 68 Genome Expresses Modest Levels of Viral miRNAs

M. Kara<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Bursa Uludag University, Bursa, 16059 Turkey

<sup>2</sup> Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 3261 USA

\*e-mail: mehmetkara@uludag.edu.tr

Murine gammaherpesvirus 68 (MHV68) establishes latency mainly in B cells and causes lymphomas reminiscent of human gammaherpesvirus diseases in laboratory mice. To study the molecular mechanism of virus infection and how the viral determinants control cell and eventually cause tumorigenesis, readily available latently infected cell lines are essential. For *in vitro* MHV68 latency studies, only two cell culture systems have been available. Gammaherpesviruses are known to infect developing B cells and macrophages, therefore we aimed to expand the MHV68 latently infected cell line repertoire. Here, several latently infected immature B cell and macrophage-like cell line clones were generated. Hygromycin-resistant recombinant MHV68 was isolated from a laboratory-made latent cell line, HE2.1, and propagated to develop stable cell lines that carry the viral genome under hygromycin selection. Subclones of these cell lines were analyzed for viral miRNA expression by TaqMan qPCR and assessed for expression of a lytic viral transcript M3. The cell lines maintain the viral genome as an episome shown by the digestion-circularization PCR assay. Latently infected cell lines generated here do not express viral miRNAs higher than the parental cell line. However, these cell lines may provide an alternative tool to study latency mechanisms and miRNA target identification studies.

**Keywords:** MHV68, gammaherpesvirus latency, latent cell line, murine gammaherpesvirus miRNA, digestion-circularization PCR

УДК 577.151:575.2

## РАЗРАБОТКА ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ И ЭФФЕКТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ SpCas9 НА ОСНОВЕ НН-ТЕОРИИ<sup>#</sup>

© 2024 г. G. H. Wang<sup>a, §</sup>, C. M. Wang<sup>b, c, §</sup>, X. J. Wu<sup>d, §</sup>, T. Chu<sup>e</sup>, D. W. Huang<sup>f</sup>, J. Li<sup>g, \*</sup>

<sup>a</sup> School of Food and Biotechnology, Guangdong Industry Polytechnic, Guangzhou, 510300 China

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515 China

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, Southern University of Science and Technology Hospital (SUS Tech Hospital), Shenzhen, 518000 China

<sup>d</sup> Lineberger Comprehensive Cancer Center, the University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, 27517 USA

<sup>e</sup> Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., China

<sup>f</sup> Pharmaceutical and Material Engineering School, Jinhua Polytechnic, Jinhua, 321007 China

<sup>g</sup> Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, 510515 China

\*e-mail: lijuan860103@163.com

Поступила в редакцию 01.04.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 15.08.2023 г.

Эндонуклеаза Cas9 *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) – самый популярный инструмент редактирования генов, но нецелевой мутагенез, сопровождающий ее действие, представляет серьезное ограничение. Ранее нами предложена НН-теория, в которой утверждается, что индуцированное экструзией гибрида sgRNA/DNA (гибрид) усиление гидрофобных взаимодействий (hydrophobic interaction) между гибридом и REC3/HHN является ключевым фактором инициации расщепления. Теперь на основе НН-теории проанализировано взаимодействие домена REC3 с гибридом и получено 8 мутантных сайтов. Мы сконструировали 8 вариантов SpCas9 (V1–V8), использовали цифровую капельную ПЦР для оценки SpCas9-индуцированных инделей ДНК в клетках человека и разработали высокоточные варианты эндонуклеазы. Таким образом, НН-теория может быть использована для дальнейшей оптимизации систем редактирования генома, опосредованных SpCas9, а полученные варианты V3, V6, V7 и V8 SpCas9 можно рассматривать как перспективный инструмент для приложений, требующих высокоточного редактирования генома.

**Ключевые слова:** SpCas9, НН-теория, варианты, внецелевое расщепление, эффективность расщепления, оптимизация

**DOI:** 10.31857/S0026898424010158, **EDN:** NTCLJI

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Komor A.C., Badran A.H., Liu D.R. (2017) CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*. **169**, 559.
2. Doudna J.A. (2020) The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. **578**, 229–236.
3. Zhu X., Clarke R., Puppala A.K., Chittori S., Merk A., Merrill B.J., Simonovic M., Subramaniam S. (2019) Cryo-EM structures reveal coordinated domain motions that govern DNA cleavage by Cas9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 679–685.
4. Wang G., Li J. (2021) Review, analysis, and optimization of the CRISPR *Streptococcus pyogenes* Cas9 system. *Med. Drug Discov.* **9**, 100080. doi: 10.1016/j.medidd.(2021)100080
5. Mozo-Villariás A., Querol E. (2019) A protein self-assembly model guided by electrostatic and hydrophobic dipole moments. *PLoS One*. **14**, e0216253.
6. Shashikala H.B.M., Chakravorty A., Alexov E. (2019) Modeling electrostatic force in protein-protein recognition. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 94.
7. Grdadolnik J., Merzel F., Avbelj F. (2017) Origin of hydrophobicity and enhanced water hydrogen bond strength near purely hydrophobic solutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 322–327.
8. Galamba N. (2013) Water's structure around hydrophobic solutes and the iceberg model. *J. Phys. Chem. B*. **117**, 2153–2159.

<sup>#</sup> Полный текст статьи на английском языке размещен на сайте издательства Springer – <https://link.springer.com/journal/11008>

<sup>§</sup> Авторы внесли равный вклад.

9. Kinoshita M. (2009) Importance of translational entropy of water in biological self-assembly processes like protein folding. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1064–1080.
10. Harano Y., Kinoshita M. (2004) Large gain in translational entropy of water is a major driving force in protein folding. *Chem. Phys. Lett.* **399**, 342–348. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.09.140
11. Harano Y., Kinoshita M. (2005) Translational-entropy gain of solvent upon protein folding. *Biophys. J.* **89**, 2701–2710.
12. Feng B., Sosa R.P., Martensson A.K.F., Jiang K., Tong A., Dorfman K.D., Takahashi M., Lincoln P., Bustamante C.J., Westerlund F., Norden B. (2019) Hydrophobic catalysis and a potential biological role of DNA unstacking induced by environment effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 17169–17174.
13. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. (2006) Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* **34**, 564–574.
14. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M.D. (2018) DNA melting and energetics of the double helix. *Phys. Life Rev.* **25**, 1–21.
15. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. (2017) Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature.* **550**, 407–410.
16. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* **529**, 490–495.
17. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284.
18. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* **351**, 84–88.
19. Guo M., Ren K., Zhu Y., Tang Z., Wang Y., Zhang B., Huang Z. (2019) Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9. *Cell Res.* **29**, 183–192.
20. Wang G., Wang C., Chu T., Wu X., Anderson C.M., Huang D., Li J. (2023) Deleting specific residues from the HNH linkers creates a CRISPR-SpCas9 variant with high fidelity and efficiency. *J. Biotechnol.* **368**, 42–52.
21. Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A. (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques.* **13**, 444–449.
22. Rose J.C., Stephany J.J., Valente W.J., Trevillian B.M., Dang H.V., Bielas J.H., Maly D.J., Fowler D.M. (2017) Rapidly inducible Cas9 and DSB-ddPCR to probe editing kinetics. *Nat. Methods.* **14**, 891–896.
23. Miyaoka Y., Mayerl S.J., Chan A.H., Conklin B.R. (2018) Detection and quantification of HDR and NHEJ induced by genome editing at endogenous gene loci using droplet digital PCR. *Methods Mol. Biol.* **1768**, 349–362.
24. Wei C.T., Maly D.J., Fowler D.M. (2020) Temporal and rheostatic control of genome editing with a chemically-inducible Cas9. *Methods Enzymol.* **633**, 119–141.
25. Dibitetto D., La Monica M., Ferrari M., Marini F., Pelliccioli A. (2018) Formation and nucleolytic processing of Cas9-induced DNA breaks in human cells quantified by droplet digital PCR. *DNA Repair (Amst.)*. **68**, 68–74.
26. Helfer-Hungerbuehler A.K., Shah J., Meili T., Boenzli E., Li P., Hofmann-Lehmann R. (2021) Adeno-associated vector-delivered CRISPR/SaCas9 system reduces feline leukemia virus production *in vitro*. *Viruses.* **13**(8), 1636.
27. Guschin D.Y., Waite A.J., Katibah G.E., Miller J.C., Holmes M.C., Rebar E.J. (2010) A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol. Biol.* **649**, 247–256.
28. Auer B., Kumar R., Schmidt J.R., Skinner J.L. (2007) Hydrogen bonding and Raman, IR, and 2D-IR spectroscopy of dilute HOD in liquid D<sub>2</sub>O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 14215–14220.
29. Shibata M., Nishimasu H., Kodera N., Hirano S., Ando T., Uchihashi T., Nureki O. (2017) Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Commun.* **8**, 1430.
30. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* **156**, 935–949.
31. Palecz B. (2002) Enthalpic homogeneous pair interaction coefficients of L-alpha-amino acids as a hydrophobicity parameter of amino acid side chains. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6003–6008.
32. Fauchère J.L., Charton M., Kier L.B., Verloop A., Pliska V. (1988) Amino acid side chain parameters for correlation studies in biology and pharmacology. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**, 269–278.
33. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–826.
34. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832.
35. Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., Turk R., Jacobi A.M., Collingwood M.A., Bode N.M., McNeill M.S., Yan S., Camarena J., Lee C.M., Park S.H., Wiebking V., Bak R.O., Gomez-Os-

pina N., Pavel-Dinu M., Sun W., Bao G., Porteus M.H., Behlke M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224.

36. Kulcsár P.I., Tálas A., Tóth E., Nyeste A., Ligeti Z., Welker Z., Welker E. (2020) Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. *Nat. Commun.* **11**, 1223.

## The Development of SpCas9 Variants with High Specificity and Efficiency Based on the HH Theory<sup>§</sup>

G. H. Wang<sup>1, §</sup>, C. M. Wang<sup>2, 3, §</sup>, X. J. Wu<sup>4, §</sup>, T. Chu<sup>5</sup>, D. W. Huang<sup>6</sup>, and J. Li<sup>7, \*</sup>

<sup>1</sup> School of Food and Biotechnology, Guangdong Industry Polytechnic, Guangzhou, 510300 China

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515 China

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Southern University of Science and Technology Hospital (SUS Tech Hospital), Shenzhen, 518000 China

<sup>4</sup> Lineberger Comprehensive Cancer Center, the University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, 27517 USA

<sup>5</sup> Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., China

<sup>6</sup> Pharmaceutical and Material Engineering School, Jinhua Polytechnic, Jinhua, 321007 China

<sup>7</sup> Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, 510515 China

\* e-mail: [lijuan860103@163.com](mailto:lijuan860103@163.com)

*Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) is the most popular tool in gene editing; however, off-target mutagenesis is one of the biggest impediments in its application. In our previous study, we proposed the HH theory, which states that sgRNA/DNA hybrid (hybrid) extrusion-induced enhancement of hydrophobic interactions between the hybrid and REC3/HNH is a key factor in cleavage initiation. Based on the HH theory, we analyzed the interactions between the REC3 domain and hybrid and obtained 8 mutant sites. We designed 8 SpCas9 variants (V1–V8), used digital droplet PCR to assess SpCas9-induced DNA indels in human cells, and developed high-fidelity variants. Thus, the HH theory may be employed to further optimize SpCas9-mediated genome editing systems, and the resultant V3, V6, V7, and V8 SpCas9 variants may be valuable for applications requiring high-precision genome editing.

**Keywords:** SpCas9, HH theory, variants, off-target, cleavage efficiency, optimization



УДК 577.21

## ИЗУЧЕНИЕ СТОХАСТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ БЕЛКОВ Cas В ЭКЗОСОМЫ

© 2024 г. Н. И. Пономарева<sup>a, b, c, \*</sup>, С. А. Брезгин<sup>a, b</sup>, А. П. Костюшева<sup>a</sup>,  
О. В. Слатинская<sup>d</sup>, Е. О. Баюрова<sup>e</sup>, И. В. Гордейчук<sup>e</sup>, Г. В. Максимов<sup>d</sup>,  
Д. В. Соколова<sup>g</sup>, Г. Бабаева<sup>g</sup>, И. И. Хан<sup>g</sup>, В. С. Покровский<sup>g</sup>, А. С. Лукашев<sup>a</sup>,  
В. П. Чуланов<sup>f</sup>, Д. С. Костюшев<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Институт медицинской паразитологии и тропической медицины

им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова  
(Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

<sup>b</sup> Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340 Россия

<sup>c</sup> Кафедра фармацевтической и токсикологической химии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119146 Россия

<sup>d</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>e</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова  
Российской академии наук, Москва, 108819 Россия

<sup>f</sup> Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний  
Минздрава России, Москва, 127994 Россия

<sup>g</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва,  
115478 Россия

\*e-mail: [ponomareva.n.i13@yandex.ru](mailto:ponomareva.n.i13@yandex.ru)

Поступила в редакцию 17.06.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Системы CRISPR/Cas являются перспективными молекулярными инструментами для направленных манипуляций с генетическим материалом, включая редактирование генома, регуляцию транскрипции генов, модификацию эпигенома. Несмотря на высокую эффективность и возможность использования систем CRISPR/Cas при различных наследственных, инфекционных и онкологических заболеваниях, отсутствие эффективных методов упаковки и доставки этих систем *in vivo* препятствует их внедрению в клиническую практику. Современные платформы для доставки генетических конструкций на основе синтетических наночастиц органической и неорганической природы имеют ряд ограничений, а именно низкую эффективность упаковки, иммуногенность, токсичность, отсутствие тропности, сложный и дорогой процесс производства. Экзосомы, секретруемые клетками эукариот, представляют собой биологические наночастицы, которые обладают высочайшей биосовместимостью, физико-химической стабильностью и способностью преодолевать биологические барьеры. Безопасность использования экзосом подтверждена в многочисленных клинических исследованиях. В последние годы экзосомы рассматриваются как перспективные носители для доставки систем CRISPR/Cas *in vivo*. В представленной работе на различных линиях клеток определена эффективность стохастической упаковки систем CRISPR/Cas в экзосомы. Показано, что белок Cas9 локализуется в компартменте биогенеза экзосом, однако стохастическая упаковка Cas9 в экзосомы обеспечивает попадание белка Cas9 всего в ~1% целевых клеток. Низкая эффективность стохастической упаковки белка Cas9 не позволяет использовать этот метод в генетическом редактировании. Следовательно, необходимы новые методы и технологии загрузки CRISPR/Cas-систем в экзосомы.

**Ключевые слова:** наночастицы, CRISPR/Cas, внеклеточные везикулы, экзосомы, доставка

**DOI:** 10.31857/S0026898424010166, **EDN:** NSSZYP

### ВВЕДЕНИЕ

CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein) — известный молекулярный инструмент,

созданный на основе систем противовирусного иммунитета бактерий и архей [1, 2]. С 2013 года системы CRISPR/Cas были адаптированы для модификации ДНК и РНК в клетках эукари-

от и манипуляций с генетическим материалом млекопитающих [3]. Описаны сотни различных систем CRISPR/Cas, а изучение генома различных микроорганизмов ежегодно приводит к открытию и описанию десятков новых систем CRISPR/Cas.

В простейшем случае основными компонентами систем CRISPR/Cas являются Cas-белок и РНК-проводник. Классические системы нуклеаз CRISPR/Cas вносят двухцепочечные разрывы в ДНК, которые могут репарироваться с образованием мутаций, в основном по типу делеций и вставок нуклеотидов [2]. Одни из первых систем CRISPR/Cas, адаптированных к направленному редактированию генома, были выделены из бактерий *Streptococcus pyogenes*. Описаны многочисленные ортологичные варианты CRISPR/Cas из таких организмов, как *Staphylococcus aureus*, *S. thermophilus*, *Neisseria meningitidis*, *Francisella novicida*, *Campylobacter jejuni* и др. [4]. Ортологичные системы различаются молекулярной массой Cas-белков (минимальную массу имеет Cas-белок *C. jejuni* – 114.91 кДа), а также спектром потенциальных мишеней и специфичностью действия. С помощью геной инженерии на основе CRISPR/Cas созданы многочисленные молекулярные инструменты для манипуляции с ДНК, РНК, белками, изучения трехмерной структуры генома и др. [5, 6].

Подходы на основе CRISPR/Cas позволили исправлять мутации, вызывающие развитие наследственных заболеваний, резистентность к лекарственным препаратам [7, 8], а также разрушать и элиминировать вирусы, инфицирующие человека [9–13]. В частности, уже проводят клинические исследования подходов к лечению транстиретинового амилоидоза, серповидноклеточной анемии,  $\beta$ -талассемии и ВИЧ-инфекции [14]. Системы CRISPR/Cas могут использоваться для создания аллогенных CAR-T-клеток, эффективных при опухолевых заболеваниях. В фазе I клинических исследований находятся CRISPR-модифицированные CAR-T-клетки, направленные на некоторые лимфомы и солидные опухоли [15].

Несмотря на большие терапевтические перспективы систем CRISPR/Cas, одним из основных препятствий к их использованию является отсутствие эффективных методов упаковки и доставки белков Cas и РНК-проводников [16]. Cas-белки не способны самостоятельно проникать в клетки; кроме того, сывороточные белки, протеазы, РНКазы и антитела могут быстро связывать и инактивировать комплексы CRISPR/Cas при системном введении [16]. Использование традиционных систем доставки на основе органических и неорганических наночастиц также за-

труднено, поскольку Cas-белки имеют большую молекулярную массу и положительный заряд. Кроме того, разнообразие белков Cas и их физико-химических характеристик делает практически невозможным создание универсальных носителей для доставки CRISPR/Cas [16].

Методы доставки систем CRISPR/Cas подразделяются на вирусные и невирусные [16]. К вирусным относится упаковка и доставка систем генетического редактирования с помощью аденоассоциированных вирусов, аденовирусов или лентивирусов [17, 18]. Однако использование вирусных векторов приводит к неконтролируемой длительной экспрессии CRISPR/Cas в клетках, способствуя их нецелелевой активности. Исходами нецелелевого разрезания CRISPR/Cas могут быть короткие делеции, делеции длиной несколько тысяч нуклеотидов и др. [19]. В результате возможно нарушение функции генов и хромосомные aberrации. В этой связи наиболее эффективным и безопасным подходом считается использование невирусных методов доставки короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas [20]. Один из перспективных невирусных методов доставки – использование биологических наночастиц, в частности секретируемых экзосом либо внеклеточных наночастиц [21].

Экзосомы – наноразмерные внеклеточные везикулы, образуемые путем слияния мультивезикулярных телец с плазматической мембраной; являются механизмом межклеточной коммуникации, поскольку переносят различные сигнальные молекулы, включая короткие РНК, пептиды, лиганды, рецепторы и др. [22, 23]. Экзосомы секретируются практически всеми видами клеток человека, включая клетки различных опухолей. Экзосомы были описаны еще в 1980-х годах, однако только в конце 2010-х впервые показали возможность доставки терапевтических биомолекул (малых интерферирующих РНК) с помощью экзосом [24].

Преимущества экзосом как средств доставки лекарственных соединений основаны на их уникальных характеристиках, обусловленных естественным происхождением, а также высокой биосовместимостью и безопасностью [25, 26]. Внеклеточные везикулы обладают высокой пакующей емкостью, они могут эффективно преодолевать внеклеточные и внутриклеточные биологические барьеры [27]. В отличие от синтетических наночастиц, экзосомы, попавшие в кровоток, экранируют от внешних воздействий транспортируемое содержимое (карго). Важным преимуществом экзосом является возможность программирования их свойств, в том числе свойств поверхности, что можно использовать в создании тропных экзосом для целевой

доставки в органы и нужные ткани [28]. Особенно важно, что за последние несколько лет фактически удалось решить основные технические задачи, связанные с масштабной продукцией и очисткой экзосом, что позволяет нарабатывать их в производственных объемах [29].

Возможность стохастической (случайной) упаковки рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas в экзосомы опухолевых клеток и их переноса в клетки человека были показаны ранее [30]. Известно, что в клетках, подвергшихся онкотрансформации, изменены процессы сигнальной трансдукции, нарушены системы адгезии и транспорта. Подобные свойства способствуют более активному транспорту компонентов системы в экзосомы и их секреции [31]. В нашей работе впервые изучена эффективность стохастической упаковки комплексов CRISPR/Cas в экзосомы на разных линиях клеток: нетрансформированных, трансформированных и раковых.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеток человека.** Линии клеток человека культивировали в условиях, представленных в табл. 1. Клетки рассевали в 6-луночные планшеты до достижения ~60% конфлюентности в день трансфекции. Трансфекцию проводили с помощью реагента Lipofectamine3000 согласно протоколу производителя (“Thermo Fisher Scientific”, США) плазмидой, кодирующей белок dCas9-BFP (addgene #46910), плазмидой CD63-EGFP (addgene #62964) либо Rab27A-EGFP (addgene #49605). Эффективность трансфекции оценивали по числу EGFP-положительных клеток по каналу FITC на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (“BD Biosciences”, США). Данные получены с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и проанализированы с помощью программного обеспечения NovoExpress (“ACEA Biosciences”, США).

**Таблица 1.** Линии клеток, использованные в работе\*

Клеточная линия	Описание	Условия культивирования
HeLa S3	Эпителиоидная карцинома шейки матки	Среда EMEM Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – NEAA 1%, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
Jurkat	T-лимфобластный лейкоз	Среда RPMI 1640 Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
SK-HEP-1	Аденокарцинома печени человека	Среда EMEM Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – NEAA 1%, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
RPMI 1788	Лимфобластоид кроветворной ткани человека	Среда RPMI 1640 Сыворотка – эмбриональная бычья, 20% Др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
AsPC-1	Аденокарцинома поджелудочной железы человека	Среда RPMI 1640 Сыворотка – эмбриональная бычья, 20% Др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
RPMI 8226	Миелома человека	Среда RPMI 1640 Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
MCF-7	Аденокарцинома молочной железы человека	Среда EMEM Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – NEAA 1%, бычий инсулин, 10 мкг/мл, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
HepG2	Гепатоцеллюлярная карцинома человека	Среда DMEM Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина
HEK293T	Эмбриональные почки человека	Среда DMEM Сыворотка – эмбриональная бычья, 10% Др. компоненты – 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина

\* Линии клеток получены от ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”.

**Флуоресцентная и конфокальная микроскопия.** Флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопах LeicaDMI6000 и Leica Thunder Imager 3D (“Leica”, Германия). Колокализацию изучали с помощью конфокальной микроскопии и технологии Airyscan. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН. Колокализацию анализировали в программе ImageJ с помощью утилиты JACoP.

**Получение и очистка экзосом.** Линию клеток НЕК293Т использовали для получения экзосом. Клетки культивировали во флаконах T175 в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л), 2 мкМ *L*-глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, “Biosera”, FB-1280, Франция), очищенной от экзосом с помощью ультрафильтрации на концентраторах Amicon Ultra-15 100 кДа (“Merck Millipore”, Германия), как описано ранее [32]. Клетки рассеивали во флаконы T175 для достижения ~70% конфлюентности в день трансфекции. Клетки трансфицировали с помощью полиэтиленimina плазмидой CD63EGFP либо плазмидой, кодирующей dCas9EGFP. На следующий день после трансфекции клетки отмывали и через 48 ч добавляли полную среду DMEM с 10% FBS, очищенной от экзосом. Экзосомы выделяли из 300 мл культуральной среды с помощью анионообменной хроматографии на приборе BioRad BioLogic LP (“BioRad”, США) с использованием анионообменной смолы MacroPrep DEAE Media (“BioRad”) с последующей ультрафильтрацией на центрифужных концентраторах (Amicon Ultra-15, 100 кДа, “Merck”, Германия). Анионообменную колонку калибровали с использованием буфера А (50 мМ HEPES, 100 мМ NaCl). Культуральную среду центрифугировали на скорости 2000 g в течение 10 мин, а затем наносили на хроматографическую колонку со скоростью 6.5 мл/мин. Далее колонку промывали буфером А, а затем для удаления белковой фракции, не содержащей экзосомы, проводили ступенчатую промывку: 95% буфера А/5% буфера В (50 мМ HEPES, 2 М NaCl) – 5 объемов колонки, 90% буфера А/10% буфером В – 10 объемов колонки. Фракцию, содержащую везикулы, элюировали при помощи 60% буфера А/40% буфера В и промывали колонку буфером В. Элюат концентрировали, далее образцы разбавляли PBS для замены буфера и дважды повторяли концентрирование.

**Определение размера и  $\zeta$ -потенциала экзосом.** Распределение экзосом по размеру определяли при помощи метода динамического светорассеяния (DLS), а  $\zeta$ -потенциал измеряли методом электрофоретического светорассеяния (ELS) с использованием Zetasizer NanoZS

и программного обеспечения Zetasizer (версия 8.01.4906) (“Malvern Instruments”, Великобритания). Проведено пять измерений образца при следующих параметрах: экзосомы разводили в 1000 раз от исходной концентрации фосфатным буфером, отфильтрованным через регенерированную целлюлозу (“Corning”, США) с диаметром пор 0,2 мкм. Для определения размера экзосом 1.5 мл полученного раствора помещали в полистирольную одноразовую кювету для измерения DLS (DTS0012, “Malvern”) с толщиной поглощающего слоя 12 мм и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей. Измерения проводили в термостатирующей ячейке при 25°C, время адаптации образца к температуре – 60 с, количество снятых измерений – 100. При измерении  $\zeta$ -потенциала образец помещали шприцем в одноразовую капиллярную поликарбонатную U-образную кювету (DTS1070, “Malvern”) с золотыми электродами. Измерение  $\zeta$ -потенциала проводили при 25°C, время адаптации образца к температуре составило 100 с. Фон измеряли, используя фильтрованный раствор фосфатного буфера.

**Вестерн-блот-анализ.** Экзосомы лизировали в 50 мкл буфера RIPA (50 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), 1 мМ ортованадата натрия, 1 мМ NaF). Образцы смешивали с буфером для образцов (Laemmli buffer, 60 мкг/лунка) и загружали в полиакриламидный гель с 10% SDS с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 5%-ным молоком в буфере TBS-T (20 мМ Трис pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20). Окрашивание проводили первичными антителами к маркерам экзосом (EXOAB-KIT-1 для CD63, CD81 и Hsp70, “SBI”, США) 1 : 1000 в течение ночи при 4°C. Далее мембраны трижды промывали буфером TBS-T и инкубировали в течение 1 ч с антителами козы к антителам кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена (Ab6721, “Abcam”, Великобритания), или с антителами козы к антителам мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (Ab6787; “Abcam”), в разведении 1 : 5000 в 5%-ном молоке в буфере TBS-T. Мембраны промывали 3 раза буфером TBS-T. Хемилюминесцентный сигнал получен с помощью SuperSignal™ West Femto Maximum (“Thermo-Fisher Scientific”) и обнаружен на рентгеновской пленке после экспозиции в течение 2 ч.

**Оценка стохастической упаковки белка Cas в экзосомы.** Выделенные экзосомы добавляли к клеткам НЕК293Т, которые культивировали в полной среде DMEM, очищенной от экзосом, и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (“BD Biosciences”, США) через 2 и 6 ч после добавления частиц.

В процессе пробоподготовки из планшетов удаляли культуральную среду и дважды промывали клетки в PBS. Данные анализировали с использованием программного обеспечения NovoExpress (“ACEA Biosciences”, США).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

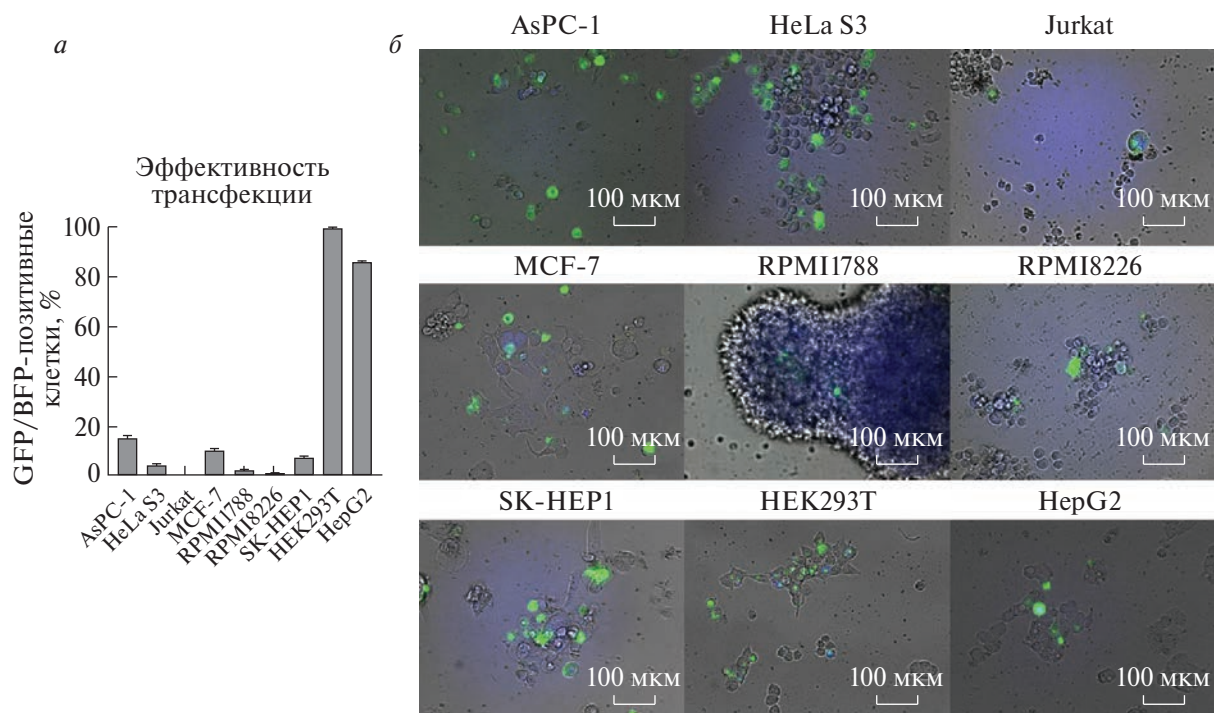
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Определение эффективности трансфекции линий клеток человека

На первом этапе определения возможности использования различных трансформированных и нетрансформированных линий клеток человека для упаковки белков Cas9 оценили уровни трансфекции 9 линий клеток человека. Высокая

эффективность трансфекции является необходимым условием использования клеточных линий при рутинном получении экзосом, загруженных белком Cas9. Трансфекцию проводили с помощью реагента Lipofectamine3000 с плазмидами CD63-EGFP и dCas9-BFP (рис. 1а) по оптимизированному протоколу, описанному ранее.

Уровень GFP/BFP-позитивных клеток в большинстве клеточных культур не превышал 15% (линии клеток HeLa S3, Jurkat, SK-HEP-1, RPMI 1788, AsPC-1, RPMI 8226, MCF-7) (рис. 1). Напротив, эффективность трансфекции линий клеток HEK293T и HepG2 составляла до 99 и 85% соответственно. Следовательно, клетки HEK293T и HepG2 наиболее пригодны для изучения стохастической упаковки Cas-белков в экзосомы с использованием трансфекции плазмидами, кодирующими репортерные Cas-белки.



**Рис. 1.** Трансфекция трансформированных и нетрансформированных клеток человека плазмидами CD63-EGFP и dCas9-BFP. *а* – График эффективности котрансфекции изучаемых линий клеток. *б* – Микрофотографии линий клеток, трансфицированных плазмидой CD63-EGFP. EGFP – зеленый флуоресцентный белок. BFP – синий флуоресцентный белок.

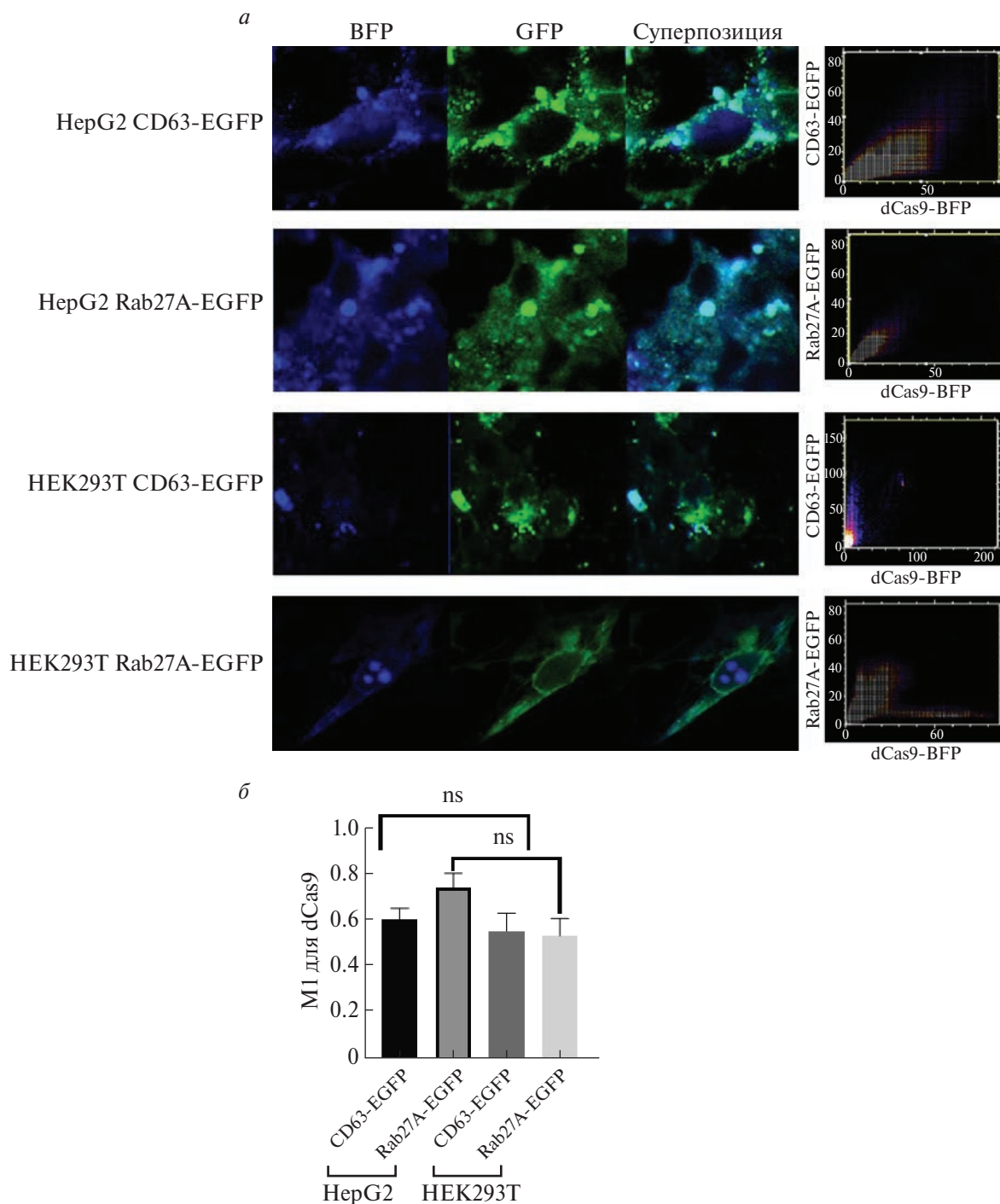
### *Cas9* колокализуется с факторами биогенеза экзосом

Колокализация белков с компонентами биогенеза экзосом, например CD63 [33] и Rab27A [34], свидетельствует о возможности их транспорта в мультивезикулярные тельца (MVB) и упаковке в экзосомы [35]. С помощью

конфокальной микроскопии проведен анализ колокализации репортерного белка dCas9-BFP с CD63-EGFP и Rab27A-EGFP в клетках HEK293T и HepG2 (рис. 2а). Эффективность колокализации оценивали с помощью коэффициента Мандерса 1 (M1) – соотношения суммарной интенсивности сигнала пикселей одного канала (dCas9-BFP), также содержа-

ших сигнал второго канала (CD63-EGFP либо Rab27A-EGFP), и суммарной интенсивности сигналов всех пикселей первого канала (рис. 2б). Коэффициенты M1 рассчитывают в диапа-

зоне от 0 до 1 [36]. При этом низкий уровень колокализации характеризуется значениями от 0.2 до 0.4, средний – от 0.4 до 0.6, а высокий от 0.6 и выше [37].



**Рис. 2.** Оценка уровней колокализации белка dCas9-BFP с факторами биогенеза экзосом в линиях клеток HEK293T и HepG2. *a* – Репрезентативные конфокальные изображения клеток, трансфицированных dCas9-BFP с CD63-EGFP либо Rab27A-EGFP. В крайнем правом ряду представлены цитофлуорограммы светимости dCas9-BFP и CD63-EGFP либо Rab27A-EGFP. *б* – Полуколичественные данные колокализации dCas9-BFP с белками CD63-EGFP и Rab27A-EGFP, рассчитанные с помощью коэффициента M1. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям.

Значения коэффициента колокализации M1 для dCas9-BFP и CD63-EGFP на линиях клеток HEK293T и HepG2 составили  $0.55 \pm 0.08$  и  $0.61 \pm 0.05$  соответственно. При этом показан высокий уровень колокализации dCas9 с белком Rab27A в линии HepG2 ( $0.74 \pm 0.06$ ) и средний уровень колокализации сигналов в клетках HEK293T ( $0.54 \pm 0.07$ ). Эти результаты свидетельствуют о высоких уровнях колокализации dCas9 с белками-маркерами экзосом – Rab27A и CD63 – в линии клеток HepG2. При этом сравнение колокализации сигналов dCas9/CD63 и dCas9/Rab27A между линиями клеток HEK293T и HepG2 не выявило статистически значимых различий, несмотря на меньшие значения M1 в клетках HEK293T.

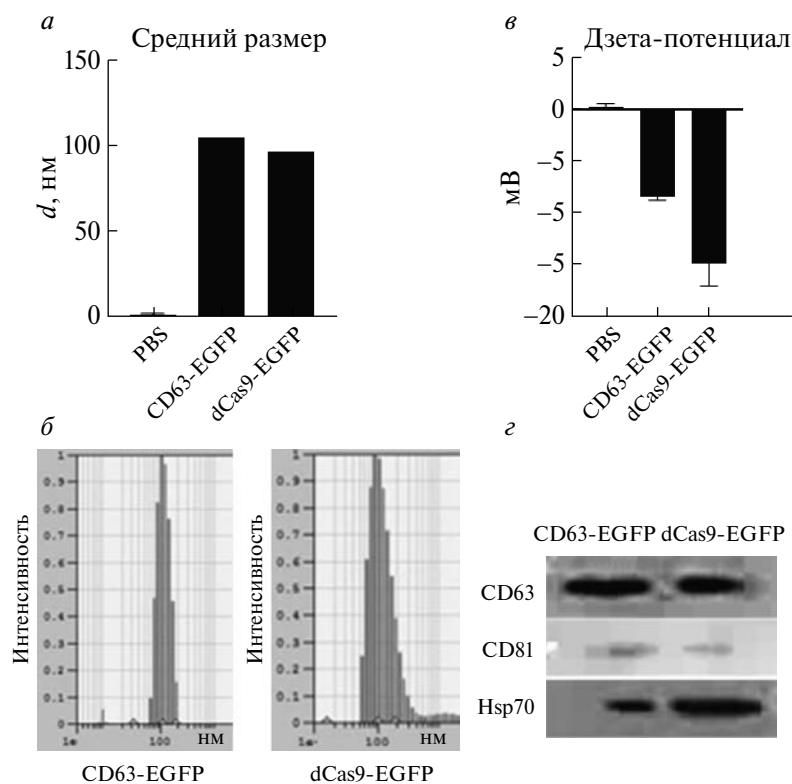
По совокупности результатов трансфекции клеток и колокализации Cas9 с факторами биогенеза экзосом для дальнейшего изучения стохастической упаковки Cas9-белков в экзосомы была выбрана линия HEK293T.

#### Физические и биологические характеристики экзосом

Для получения экзосом клетки HEK293T сначала трансфицировали плазидами, кодирующими CD63-EGFP либо dCas9-BFP. Экзосо-

мы получали из трансфицированных и нетрансфицированных контрольных клеток HEK293T с помощью анионообменной хроматографии с последующим этапом концентрирования методом ультрафильтрации (см. Экспериментальную часть) [38].

Физические свойства экзосом изучали с помощью метода динамического светорассеяния: частицы имели средний размер 96 нм (экзосомы dCas9-EGFP) и 104 нм (экзосомы CD63-EGFP) (рис. 3а). Анализ распределения частиц по размеру выявил высокую однородность экзосом в изолятах (рис. 3б). Выделенные частицы имели отрицательный заряд (рис. 3в): средние значения  $\zeta$ -потенциала составляли -14 мВ у экзосом dCas9-EGFP и -8 мВ у экзосом CD63-EGFP. Согласно рекомендациям MISEV [39, 40], для подтверждения природы выделенных биологических наночастиц изучили также экспрессию маркеров экзосом: CD63, CD81 и Hsp70 (рис. 3г). Оказалось, что изоляты биологических наночастиц позитивны по всем трем изученным биомаркерам. В совокупности полученные данные свидетельствуют о соответствии выделенных изолятов биологических наночастиц критериям экзосом, а также указывают на отсутствие значительного эффекта трансфекции экзосом-продуцирующих клеток плазидами, кодирующими CD63 и dCas9.

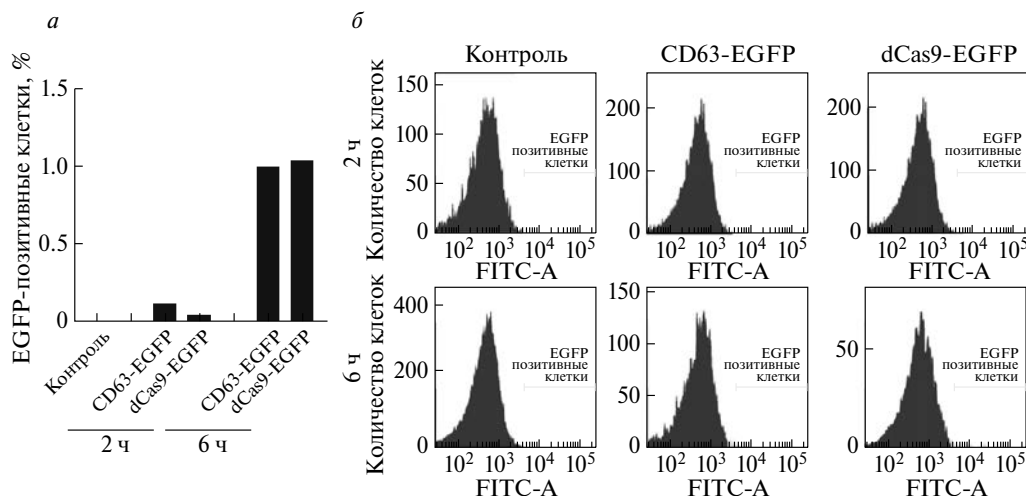


**Рис. 3.** Характеристика наночастиц. *а* – Анализ измерения размера экзосом методом динамического светорассеяния. *д* – Диаметр, нм. *б* – Распределение частиц по размеру. *в* – Анализ  $\zeta$ -потенциала наночастиц. *г* – Вестерн-блот-анализ экспрессии белков CD63, CD81, Hsp70 в изолятах биологических наночастиц.

*Стохастическая упаковка белка Cas9 в экзосомы*

С целью анализа стохастической упаковки белка Cas9 в экзосомы изоляты экзосом, выделенные из клеток, трансфицированных CD63-EGFP либо dCas9-EGFP, использовали для обработки клеток НЕК293Т. Через

2 и 6 ч после добавления экзосом методом проточной цитофлуориметрии оценивали число EGFP-позитивных клеток (рис. 4а). Через 2 ч после добавления экзосом EGFP-позитивные клетки фактически отсутствовали, в то время как через 6 ч детектировались редкие (до 1%) клетки, позитивные на канале FITC (рис. 4б).



**Рис. 4.** Оценка уровней стохастической упаковки белка Cas9 в экзосомы. *а* – Оценка доли EGFP-позитивных клеток методом проточной цитофлуориметрии. *б* – Гистограммы распределения сигнала EGFP в контрольных клетках и в клетках через 2 и 6 ч после добавления экзосом.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Создание универсальных систем упаковки и доставки инструментов CRISPR/Cas – одно из ключевых направлений в области биомедицины [16]. Решение проблемы невирусной доставки рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas обеспечит практическое внедрение многочисленных терапевтических подходов на основе CRISPR/Cas. Экзосомы считаются одной из наиболее перспективных систем доставки CRISPR/Cas, поскольку обладают высочайшей биосовместимостью, способностью преодолевать биологические барьеры, высокой пакующей емкостью, при этом поверхность экзосом можно программировать с помощью химических и генетических методов [16, 29]. Возможность стохастической (случайной) упаковки CRISPR/Cas в экзосомы, а также активность стохастически загруженных экзосом в экспериментах по генетическому редактированию и подавлению репликации вирусов была показана ранее, однако в последние годы предпринимаются активные попытки разработки методов усиленной и контролируемой упаковки CRISPR/Cas в экзосомы [30]. В частности, с этой целью используются технологии управляемой (индуцируемой стимулами) димеризации, включая методы индуцируемой химически [41] и светом димеризации, а также создание химерных Cas-белков с pH-чувствительными линкерами [42]

либо доменами, которые обеспечивают усиленный транспорт Cas-белков в экзосомы [43]. В данной работе впервые на различных линиях клеток исследована эффективность транспорта белков Cas9 в компартмент биогенеза экзосом, а также впервые изучен стохастический транспорт Cas9 в экзосомы.

Несмотря на выраженную колокализацию Cas9 с факторами биогенеза экзосом CD63 и Rab27A, уровни стохастической упаковки Cas9 белка в экзосомы и их доставки в целевые клетки оказываются крайне низкими и не превышают 1%. Следовательно, стохастическая упаковка белка Cas9 неэффективна и не может использоваться в практических целях генного редактирования. Одной из проблем, связанных с низким уровнем сигнала GFP (рис. 4а,б), может быть неэффективный эндосомальный выход, в результате чего может происходить внутриклеточное разрушение экзосом и их содержимого. Существует множество подходов, основанных на использовании индукторов эндолизосомного выхода, которые обеспечивают эффективное высвобождение содержимого экзосом и их внутриклеточную доставку [38, 44]. Полученные результаты свидетельствуют о неэффективности стохастической упаковки белков Cas в экзосомы. Дополнительным фактором, снижающим доставку белков Cas в составе наночастиц



в клетки-реципиенты, может быть низкая эффективность эндосомного выхода экзосом.

Стоит отметить, что в последние несколько лет были решены основные проблемы, связанные с масштабным получением биологических наночастиц, включая экзосомы [29]. В данной работе для получения и очистки экзосом использовали такой эффективный метод, как анионообменная хроматография с последующей ультрафильтрацией. Анионообменная хроматография основана на взаимодействии отрицательно заряженных наночастиц с положительно заряженной смолой. Метод характеризуется высокой скоростью получения наночастиц из десятков литров культуральной среды. Полученные таким способом частицы имеют сходный размер и отрицательный заряд поверхности, а также экспрессируют биологические маркеры, характерные для экзосом (рис. 3). Не выявлено существенных различий между экзосомами из клеток, сверхэкспрессирующих CD63-EGFP либо dCas9-EGFP (рис. 4). Стоит отметить, что результаты, полученные в отдельных работах, посвященных доставке систем генетического редактирования с помощью экзосом, могут быть завышенными за счет контаминации изолятов экзосом другими внеклеточными везикулами, включая наночастицы размером от 100 до 1000 нм, особенно при использовании таких устаревших методов, как преципитация полимерными соединениями, ультрацентрифугирование и ультрафильтрация.

В проведенном исследовании зарегистрирована высокая однородность физико-химических и биологических свойств изолятов экзосом. Низкая эффективность стохастической упаковки указывает на необходимость создания новых технологий упаковки CRISPR/Cas в экзосомы, причем обоих компонентов систем генетического редактирования (как белков Cas, так и РНК-проводников). Для получения неиммунных наночастиц с запрограммированной тропностью к определенным органам и тканям может потребоваться всесторонняя модификация клеток-продуцентов экзосом.

В заключение следует отметить, что системная доставка CRISPR/Cas, особенно органо- и тканеспецифичная, необходима для практического внедрения подходов к лечению наследственных, инфекционных и отдельных онкологических заболеваний. Стохастическая упаковка белков Cas9 в экзосомы остается неэффективной, несмотря на большие перспективы использования экзосом в качестве средств доставки CRISPR/Cas. Необходимы новые методы и подходы к направленной упаковке CRISPR/Cas в экзосомы и другие биологические наночастицы.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-15-00373). Исследования по трансфекции линий клеток человека выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006) (Покровский В.С.).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банников А.В., Лавров А.В. (2017) CRISPR/Cas9 – король геномного редактирования. *Молекуляр. биология.* **51**, 582–594.
2. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* **482**, 331–338.
3. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308.
4. Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Zari-fyan D., Goptar I., Chulanov V. (2019) Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 1779–1794.
5. Brezgin S., Kostyusheva A., Kostyushev D., Chulanov V. (2019) Dead Cas systems: types, principles, and applications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(23), 6041.
6. Kostyusheva A., Brezgin S., Babin Y., Vasilyeva I., Glebe D., Kostyushev D., Chulanov V. (2022) CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods.* **203**, 431–446.
7. Chen S., Lee B., Lee A.Y., Modzelewski A.J., He L. (2016) Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J. Biol. Chem.* **291**(28), 14457–14467.
8. Bharathkumar N., Sunil A., Meera P., Aksah S., Kannan M., Saravanan K.M., Anand T. (2022) CRISPR/Cas-based modifications for therapeutic applications: a review. *Mol. Biotechnol.* **64**, 355–372.
9. Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N., Volia V., Goptar I., Nikiforova A., Shilovskiy I., Smirnov V., Kostyushev D., Chulanov V. (2020) Clearing of foreign episomal DNA from human cells by crispra-mediated activation of cytidine deaminases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–17.
10. Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N., Bayurova E., Zakirova N., Kondrashova A., Goptar I., Nikiforova A., Sudina A., Babin Y., Gordeychuk I., Lukashov A., Zamyatin A., Ivanov A., Chulanov V. (2023) Transient and tunable CRISPRa regulation of APOBEC/AID genes for targeting hepatitis B virus. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **32**, 478–493.
11. Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Ponomareva N., Zakirova N.F., Egorshina A., Yan-

- varev D.V., Bayurova E., Sudina A., Goptar I., Niki-forova A., Dunaeva E., Lisitsa T., Abramov I., Frolova A., Lukashov A., Gordeychuk I., Zamyatnin A.A., Ivanov A., Chulanov V. (2023) Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9. *Mol. Ther. Nucl. Acids*, **31**, 482–493.
12. Костюшева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. (2019) Низкомолекулярные ингибиторы путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК усиливают противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на моделях вируса гепатита В. *Молекуляр. биология*. **53**, 311–323.
  13. Костюшева А.П., Брезгин С.А., Пономарева Н.И., Гоптарь И.А., Никифорова А.В., Гегечкори В.И., Полуэктова В.Б., Туркадзе К.А., Судина А.Е., Чуланов В.П., Костюшев Д.С. (2022) Противовирусное действие рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В *in vivo*. *Молекуляр. биология*. **56**, 884–891.
  14. Sharma G., Sharma A.R., Bhattacharya M., Lee S., Chakraborty C. (2021) CRISPR-Cas9 : a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Mol. Ther.* **29**(2), 571–586.
  15. Rafii S., Tashkandi E., Bukhari N., Al-shamsi H.O. (2022) Current status of CRISPR/Cas9 application in clinical cancer research: opportunities and challenges. *Cancers* (Basel). **14**(4), 1–14.
  16. Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Smirnov V., Volchkova E., Lukashov A., Chulanov V. (2020) Gene editing by extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–34.
  17. Li A., Lee C.M., Hurley A.E., Jarrett K.E., De Giorgi M., Lu W., Balderrama K.S., Doerfler A.M., Deshmukh H., Ray A., Bao G., Lagor W.R. (2019) A self-deleting AAV-CRISPR system for *in vivo* genome editing. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 111–122.
  18. Scott T., Moyo B., Nicholson S., Maera M.B., Watashi K., Ely A., Weinberg M.S., Arbutnot P. (2017) SsAAVs containing cassettes encoding SaCas9 and guides targeting hepatitis B virus inactivate replication of the virus in cultured cells. *Sci. Rep.* **7** (1), 7401.
  19. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**(1), 53.
  20. Jiang C., Mei M., Li B., Zhu X., Zu W., Tian Y., Wang Q., Guo Y., Dong Y., Tan X. (2017) A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and *pcsk9 in vivo*. *Cell. Res.* **27**(3), 440–443.
  21. Vader P., Mol E.A., Pasterkamp G., Schiffelers R.M. (2016) Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 148–156.
  22. Doyle L.M., Wang M.Z. (2019) Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. **8**(7), 727.
  23. Phillips W., Willms E., Hill A.F. (2021) Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: novel methods and considerations. *Proteomics*. **21**(13–14), e2000118.
  24. Alvarez-erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhali S., Wood M.J.A. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**(4), 341–345.
  25. Yang B., Chen Y., Shi J. (2019) Exosome biochemistry and advanced nanotechnology for next-generation theranostic platforms. *Adv. Mater.* **31**(2), e1802896.
  26. Kim M.S., Haney M.J., Zhao Y., Mahajan V., Deygen I., Klyachko N.L., Inskoe E., Piroyan A., Sokolsky M., Okolie O., Hingtgen S.D., Kabanov A.V., Batrakova E.V. (2016) Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*. **12**(3), 655–664.
  27. Yuan D., Zhao Y., Banks W.A., Bullock K.M., Haney M., Batrakova E., Kabanov A.V. (2017) Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*. **142**, 1–12.
  28. Kim H., Yun N., Mun D., Kang J.Y., Lee S.H., Park H., Park H., Joung B. (2018) Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**(4), 803–808.
  29. Brezgin S., Parodi A., Kostyusheva A., Ponomareva N., Lukashov A., Sokolova D., Pokrovsky V.S., Slatinskaya O., Maksimov G., Zamyatnin A.A. Jr., Chulanov V., Kostyushev D. (2023) Technological aspects of manufacturing and analytical control of biological nanoparticles. *Biotechnol. Adv.* **64**, 108122.
  30. Chen R., Huang H., Liu H., Xi J., Ning J., Zeng W., Shen C., Zhang T., Yu G., Xu Q., Chen X., Wang J., Lu F. (2019) Friend or foe? Evidence indicates endogenous exosomes can deliver functional gRNA and Cas9 protein. *Small*. **15**(38), e1902686.
  31. Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Tao Y., He Z., Chen C., Jiang Y. (2020) Exosomes : key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **5**(1), 145.
  32. Kornilov R., Puhka M., Mannerström B., Hiidenmaa H., Peltoniemi H., Siljander P., Seppänen-Kaijansinkko R., Kaur S. (2018) Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Vesicles*. **7**(1), 1422674.
  33. Hessvik N.P., Llorente A. (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**(2), 193–208.
  34. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C.F., Schauer K., Hume A.N., Freitas R.P., Goud B., Benaroch P., Hacohe N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M.C., Darchen F., Amigorena S., Moita L.F., Thery C. (2009) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**(1), 19–30.
  35. Gurung S., Perocheau D., Touramanidou L., Baruteau J. (2021) The exosome journey : from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun. Signal.* **19**(1), 47.
  36. Manders E.M., Verbeek F., Aten J. (1992) Measurement of co-localization of objects in dual colour confocal images. *J. Microsc.* **169**, 375–382.
  37. Luo T., Mitra S., McBride J.W. (2018) *Ehrlichia chaffeensis* TRP75 interacts with host cell targets. *mSphere*. **3**(2), e00147–18.

38. Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N., Bayurova E., Kondrashova A., Frolova A., Slatinskaya O., Fatkhutdinova L., Maksimov G., Zyuzin M., Gordychuk I., Lukashev A., Makarov S., Ivanov A., Zamyatnin A.A. Jr., Chulanov V., Parodi A., Kostyushev D. (2023) Hydroxychloroquine enhances cytotoxic properties of extracellular vesicles and extracellular vesicle – mimetic nanovesicles loaded with chemotherapeutics. *Pharmaceutics*. **15**(2), 534.
39. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*. **7**(1), 1535750.
40. Witwer K.W., Goberdhan D.C., O'Driscoll L., Théry C., Welsh J.A., Blenkinsop C., Buzás E.I., Di Vizio D., Erdbrügger U., Falcón-Pérez J.M., Fu Q.L., Hill A.F., Lenassi M., Lötvall J., Nieuwland R., Ochiya T., Rome S., Sahoo S., Zheng L. (2021) Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. **10**(14), e12182.
41. Gee P., Lung M.S.Y., Okuzaki Y., Sasakawa N., Iguchi T., Makita Y., Hozumi H., Miura Y., Yang L.F., Iwasaki M., Wang X.H., Waller M.A., Shirai N., Abe Y.O., Fujita Y., Watanabe K., Kagita A., Iwabuchi K.A., Yasuda M., Xu H., Noda T., Komano J., Sakurai H., Inukai N., Hotta A. (2020) Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat. Commun.* **11**(1), 1334.
42. Liang X., Gupta D., Xie J., Wouterghem E., Van Hoecke L., Van Hean J., Niu Z., Wiklander O.P.B., Zheng W., Wiklander R.J., Rui He, Doste R. Mammad, Bost J., Zhou G., Zhou H., Roudi S., Zickler A.M., Görgens A., Hagey D.W., de Jong O.G., Uy A. G., Zong Y., Mäger Imre., Perez C.M., Roberts T.C., Vader P., Vandenbroucke R.E., Nordin J.Z., EL-Andaloussiet S. (2023) Multimodal engineering of extracellular vesicles for efficient intracellular protein delivery. *bioRxiv*. 2023.04.30.535834. doi: 10.1101/2023.04.30.535834
43. Li T., Zhang L., Lu T., Zhu T., Feng C., Gao N., Liu F., Yu J., Chen K., Zhong J., Tang Q., Zhang Q., Deng X., Ren J., Zeng J., Zhou H., Zhu J. (2023) Engineered extracellular vesicle-delivered CRISPR / CasRx as a novel RNA editing tool. *Adv. Sci. (Weinh)*. **10**(10), e2206517.
44. Patel S., Kim J., Herrera M., Mukherjee A., Kabanov A.V., Sahay G. (2019) Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **144**, 90–111.

## Stochastic Packaging of Cas Proteins into Exosomes

N. I. Ponomareva<sup>1, 2, 3, \*</sup>, S. A. Brezgin<sup>1,2</sup>, A. P. Kostyusheva<sup>1</sup>, O. V. Slatinskaya<sup>4</sup>, E. O. Bayurova<sup>5</sup>, I. V. Gordeychuk<sup>5</sup>, G. V. Maksimov<sup>4</sup>, D. V. Sokolova<sup>7</sup>, G. Babaeva<sup>7</sup>, I. I. Khan<sup>7</sup>, V. S. Pokrovsky<sup>7</sup>, A. S. Lukashev<sup>1</sup>, V. P. Chulanov<sup>6</sup>, and D. S. Kostyushev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119146 Russia

<sup>4</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>5</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia

<sup>6</sup> National Medical Research Center of Tuberculosis and Infectious Diseases, Ministry of Health, Moscow, 127994 Russia

<sup>7</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

\*e-mail: ponomareva.n.i13@yandex.ru

CRISPR/Cas systems are perspective molecular tools for targeted manipulation with genetic materials, including gene editing, regulation of gene transcription, modification of epigenome etc. While CRISPR/Cas systems proved to be highly effective for correcting genetic disorders and treating infectious diseases and cancers in experimental settings, the clinical translation of these results is hampered by the lack of efficient CRISPR/Cas delivery vehicles. Modern synthetic nanovehicles based on organic and inorganic polymers have many disadvantages, including toxicity issues, the lack of targeted delivery, complex and expensive production pipelines. In turn, exosomes are secreted biological nanoparticles exhibiting high biocompatibility, physico-chemical stability, and ability to cross biological barriers. Early clinical trials found no toxicity associated with exosome injections. In recent years, exosomes have been considered as perspective delivery vehicles for CRISPR/Cas systems *in vivo*. The aim of this study was to analyze the efficacy of CRISPR/Cas stochastic packaging into exosomes at several human cell lines. Here, we show that Cas9 protein is effectively localized into the compartment of intracellular exosome biogenesis, but stochastic packaging of Cas9 into exosomes turns to be very low (~1%). As such, stochastic packaging of Cas9 protein is very ineffective, and cannot be used for gene editing purposes. Developing novel tools and technologies for loading CRISPR/Cas systems into exosomes is required.

**Keywords:** delivery, nanoparticles, CRISPR/Cas, extracellular vesicles, exosomes, gene editing

## БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОТЕАЗ ЧЕЛОВЕКА, АКТИВНЫХ ОТНОСИТЕЛЬНО ГЛИКОПРОТЕИНОВ ОБОЛОЧКИ ВИРУСОВ, НА ПРИМЕРЕ БЕЛКА ШИПА КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

© 2024 г. Е. В. Матвеев<sup>a, b, c</sup>, Г. В. Пономарев<sup>a, b</sup>, М. Д. Казанов<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

<sup>b</sup> Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

<sup>c</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: mkazanov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 02.10.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Рекомендована к публикации М.С. Гельфандом

Множество вирусов, включая коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), который стал причиной пандемии коронавирусной инфекции (COVID-19), проникает в клетку за счет активируемого протеолитическими ферментами процесса слияния клеточной и вирусной мембран. Как правило, роль протеолитических ферментов в этом случае выполняют протеазы хозяйской клетки. Идентификация активирующих протеаз – задача непростая, но важная для разработки новых противовирусных лекарственных средств. В рамках проведенного исследования мы разработали биоинформатический метод идентификации протеаз, воздействующих на белки оболочки вирусов. Предлагаемый подход включает в себя использование предсказательных моделей субстратной специфичности протеаз человека и применение метода предсказания уязвимости участков белка к протеолизу на основе его трехмерной структуры. Модели специфичности были построены для 169 протеаз человека на основании информации по их известным субстратам. Метод структурного анализа потенциальных сайтов протеолиза был разработан нами ранее и применен в представленной здесь работе совместно с моделями специфичности протеаз. Валидация предлагаемого подхода выполнялась применительно к белку шипа SARS-CoV-2, для которого хорошо изучены сайты протеолиза.

**Ключевые слова:** протеазы человека, вирусный гликопротеин, протеолитическая активация, белок шипа, SARS-CoV-2

DOI: 10.31857/S0026898424010176, EDN: NRZZBT

### ВВЕДЕНИЕ

Использование вирусами ресурсов клетки для реализации жизненного цикла, в том числе для проникновения в клетку, репликации генома и сборки вирусных частиц, хорошо известный факт [1]. В геноме вирусов обычно отсутству-

ют гены, кодирующие используемые вирусом функции клеточного аппарата хозяина. По этой причине становится достаточно сложно выявить те факторы в клетке-хозяине, которые критически важны для успешной реализации жизненного цикла вируса. Идентификация партнеров вируса в хозяйской клетке имеет решающее значение для создания новых противовирусных препаратов и разработки различных стратегий лечения вирусных инфекций [2]. Эксперименты, направленные на выяснение ответа на данный вопрос, трудоемкие и ресурсозатратные, в то время как биоинформатическое предсказание таких кле-

Сокращения: ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) – ангиотензинконвертирующий фермент-2; CS (Cleavage Score) – оценка протеолитической эффективности; PWM (Position Weight Matrix) – позиционно-весовая матрица; TMPRSS2 (Transmembrane Serine Protease 2) – трансмембранная сериновая протеаза-2.

точных факторов существенно упрощает проведение экспериментальных исследований.

Борьба с пандемией COVID-19 привела к массовому пониманию важности вирусологических исследований и необходимости всестороннего понимания жизненного цикла вызвавшего ее вируса, включая выявление всех компонентов, вовлеченных в процесс инфицирования клетки-хозяина [3]. Коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) относится к семейству Coronaviridae, а его геном представлен одноцепочечной (+) РНК. Уже идентифицирован ряд факторов клетки-хозяина, взаимодействующих с компонентами SARS-CoV-2 [4], и среди них важная роль отводится клеточным протеазам [5]. Ключевая роль протеаз заключается в активации процессов конформационного перехода поверхностного гликопротеина вируса – белка шипа (S) – в компетентную для слияния форму и слияния мембраны вирусной частицы с клеточной [6, 7].

Ранее в S-белке SARS-CoV-2 идентифицировано два критически важных сайта фузионной активности вируса под действием протеаз клетки-хозяина [8]. Первый сайт расщепления, известный как S2', расположен в домене S2 и исходно недоступен для протеаз. Только после связывания S-белка с клеточным рецептором – ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2) – на инфицируемой клетке этот сайт “открывается” для протеаз [9]. Известно, что позиция S2' подвергается расщеплению трансмембранной сериновой протеазой-2 (TMPRSS2), тем самым иницируя процесс слияния мембраны вириона с мембраной клетки [10]. Вторым протеолитическим сайтом, известным как S1/S2, расположен в области соединения субъединицы S1, содержащей рецепторсвязывающий домен (RBD), и субъединицы S2, содержащей домен слияния. Согласно современным представлениям, этот сайт расщепляется фурином в комплексе Гольджи перед упаковкой вируса [6, 11]. Это протеолитическое расщепление вызывает конформационные изменения S-белка, переводя его из так называемой “закрытой” конформации в “открытую”, что облегчает связывание S-белка с ACE2 [12]. Наличие в S-белке SARS-CoV-2 короткой аминокислотной вставки в области S1/S2, отсутствующей у близкородственных бетакоронавирусов, вызвало дискуссии о природе ее происхождения [13–16].

В ряде исследований показано, что даже в отсутствие TMPRSS2 SARS-CoV-2 может проникать в клетку через альтернативный эндоцитарный путь, называемый также “поздним” [17]. Так, Z. Liu и др. [18] обнаружили, что катепсин L активирует слияние мембраны вирусной частицы с эндолизосомальной посредством рас-

щепления S-белка вблизи S1/S2, в то время как J. Park и др. [19] предполагают, что расщепление происходит рядом с сайтом S2'. Данный путь проникновения вируса в клетку все еще остается малоизученным по сравнению с классическим, “ранним”, ACE2-опосредованным. Альтернативный эндоцитарный путь инфицирования остается предметом активных исследований [20], что особенно актуально в свете сообщений о повышенной зависимости штамма SARS-CoV-2 Omicron BA.1 именно от этого пути [21].

Целью проведенного нами исследования была разработка биоинформатического метода идентификации протеаз человека, потенциально вовлеченных в процессинг рассматриваемого вирусного белка. Для этого мы разработали модели специфичности протеаз человека относительно аминокислотной последовательности, а также использовали разработанный нами ранее метод предсказания подверженности участков белка протеолизу на основе информации о его трехмерной структуре. Валидация предложенного подхода проведена на хорошо изученном S-гликопротеине SARS-CoV-2, для которого известны как вовлеченные в его процессинг протеазы клеток человека, так и сайты расщепления.

## МЕТОДЫ

**Модели субстратной специфичности протеаз человека.** Информация о субстратах и протеолитических сайтах протеаз человека была извлечена из базы данных MEROPS [22]. Модели специфичности протеаз по аминокислотной последовательности были созданы в виде позиционно-весовых матриц (PWM), как описано в Wasserman & Sandelin [23]. Далее изложено краткое описание алгоритма построения модели. Для каждого протеолитического фермента человека из базы данных MEROPS, имеющего не менее 8 протеолитических сайтов, были рассчитаны частоты встречаемости аминокислот относительно сайта разрезания в позициях P3–P3' (обозначение согласно Schechter & Berger [24]) –  $f_{ij}$ , где  $i$  – аминокислота, а  $j$  – относительная позиция в аминокислотной последовательности. Фоновые частоты встречаемости аминокислот  $b_{ij}$  были рассчитаны для всего протеома человека. Каждой ячейке в PWM, столбцы которой представляют собой позиции P3–P3', а строки – 20 стандартных аминокислот, было присвоено значение  $r_{ij}$ , рассчитанное по формуле:  $r_{ij} = \log_2(f_{ij}/b_{ij})$ . При допущении, что каждая позиция в PWM является независимой, оценка протеолитической эффективности (CS) для конкретной пептидной связи белка была рассчитана как сумма соответствующих значений из каждого столбца P3–P3' для соответствующих аминокис-

кислот, наблюдаемых в данных позициях. Для обозначения координат расщепляемых пептидных связей использовалась позиция P1.

**Модель предсказания подверженности областей белка протеолитическому расщеплению.** Эта модель основана на анализе трехмерной структуры субстрата и описана нами ранее [25]. Далее представлено краткое описание метода. Информация о протеолитических событиях была получена из базы данных CutDB [26]. Сайты расщепления протеазами были картированы на трехмерные структуры соответствующих белков-субстратов. Набор предикторов был составлен из следующих структурных характеристик: доступность для растворителя, температурный фактор, тип вторичной структуры, а также дополнительных особенностей структуры белка, таких как длина петель и принадлежность к концевым участкам. Обучающий набор был прокурирован вручную с целью исключения данных, полученных из экспериментов с потенциально денатурированными субстратами. Такие эксперименты мы выявляли на основе наличия большого числа сайтов расщепления в гидрофобном ядре субстратов. Итоговая модель была обучена с использованием алгоритма линейного дискриминантного анализа, который продемонстрировал лучшие результаты по сравнению с другими алгоритмами машинного обучения из библиотеки scikit-learn [27].

**Данные по аминокислотной последовательности и трехмерной структуре S-белка SARS-CoV-2.** Аминокислотная последовательность S-белка SARS-CoV-2 исходного штамма Wuhan была получена из базы данных UniProt (ID: P0DTC2) [28]. Трехмерные структуры белка-шипа в “открытой” конформации (PDB ID: 6VYB), “закрытой” конформации (PDB ID: 6VXX) и в комплексе с рецептором ACE2 (PDB ID: 7DF4) были скачаны из базы данных PDB [29]. Неструктурированные участки трехмерных структур были смоделированы с помощью инструмента SWISS-MODEL с параметрами, заданными по умолчанию [30].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Модели субстратной специфичности протеаз человека*

Предсказательные модели специфичности протеаз по аминокислотной последовательности были построены для 169 протеаз человека (см. табл. S1 Дополнительных материалов). Размер данного набора протеолитических ферментов человека был определен на основе анализа информации по идентифицированным субстратам протеаз в базе данных MEROPS. Для построения предсказательных моделей специфичности фер-

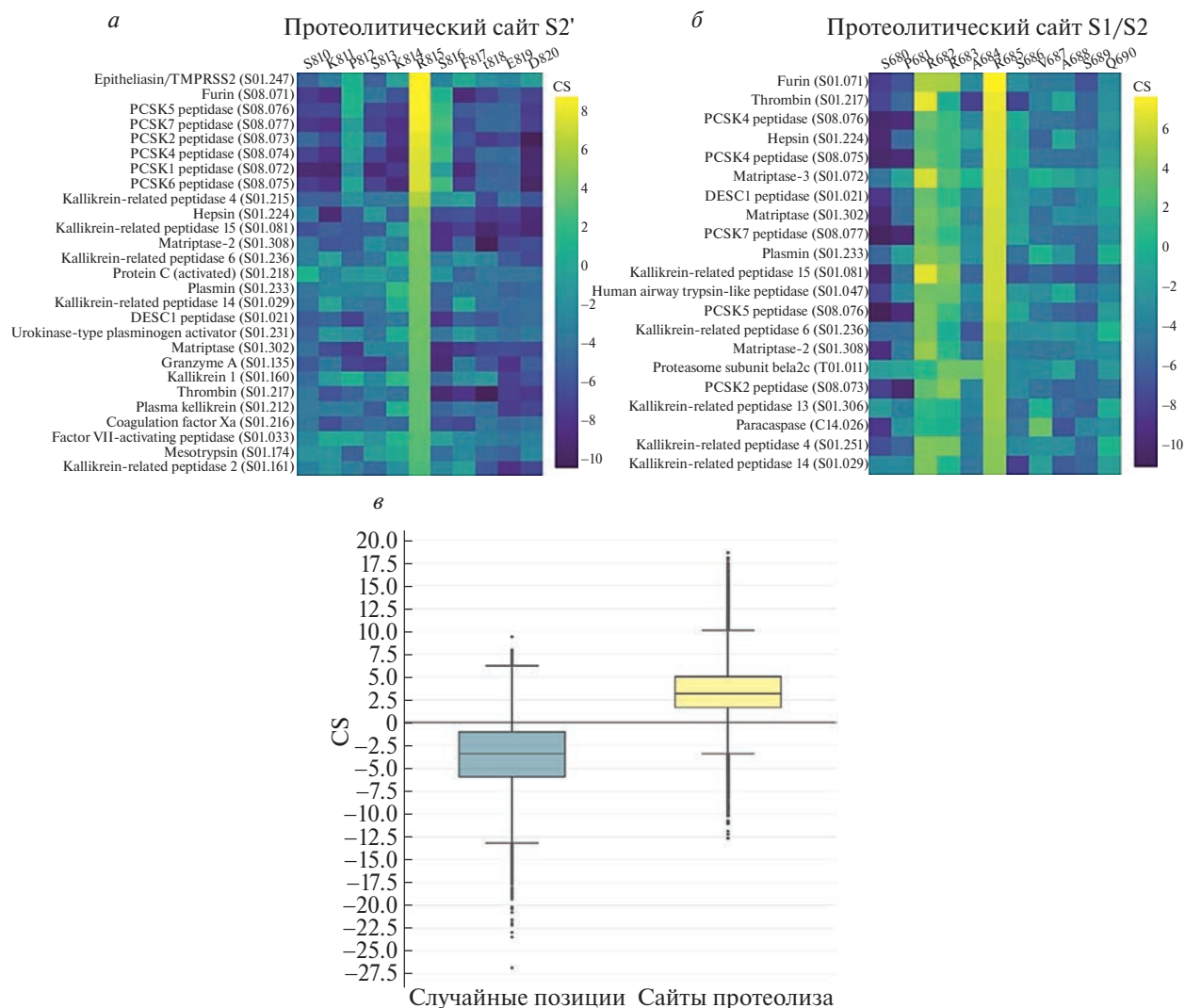
ментов по аминокислотной последовательности в виде PWM мы отобрали протеазы с широким спектром субстратов (см. раздел “Методы”). Для корректной интерпретации результатов по протеолитической эффективности, полученных построенными моделями, мы сравнили распределения оценок для известных сайтов протеолитического расщепления из базы данных MEROPS и для случайных позиций, которые с большой вероятностью не относятся к сайтам протеаз человека (рис. 1*в*). Результаты анализа распределений показали, что Q1–Q3 значения CS для протеолитических сайтов лежат в интервале [1.64, 5.02] со средним и медианным значениями 3.36 и 3.16 соответственно, тогда как для случайных позиций границы интервала Q1–Q3 для CS равны [–5.89, –1.03] со средним и медианным значениями –3.57 и –3.42 соответственно.

### *Валидация моделей субстратной специфичности протеаз на примере известных сайтов расщепления S-белка SARS-CoV-2*

Полученные модели специфичности протеаз человека апробированы на аминокислотной последовательности S-гликопротеина SARS-CoV-2 исходного штамма Wuhan. Вычисленные значения CS для сайтов S2' и S1/S2 отображены соответственно на рис. 1*а* и 1*б* (полные версии доступны на рис. S1 и S2 Дополнительных материалов, см. на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Matveev\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Matveev_rus.zip)). Для позиции S2' наибольшее значение CS относится к протеазе TMPRSS2, что полностью согласуется с текущим представлением об активации процесса слияния мембран коронавируса и инфицируемой клетки. Аналогично для позиции S1/S2 максимальному показателю CS соответствовал фурин, что также согласуется с текущими представлениями по инфекционному циклу SARS-CoV-2 [31].

### *Предсказание подверженности протеолитическому расщеплению областей белка на основе 3D-структуры для известных сайтов расщепления S-белка SARS-CoV-2*

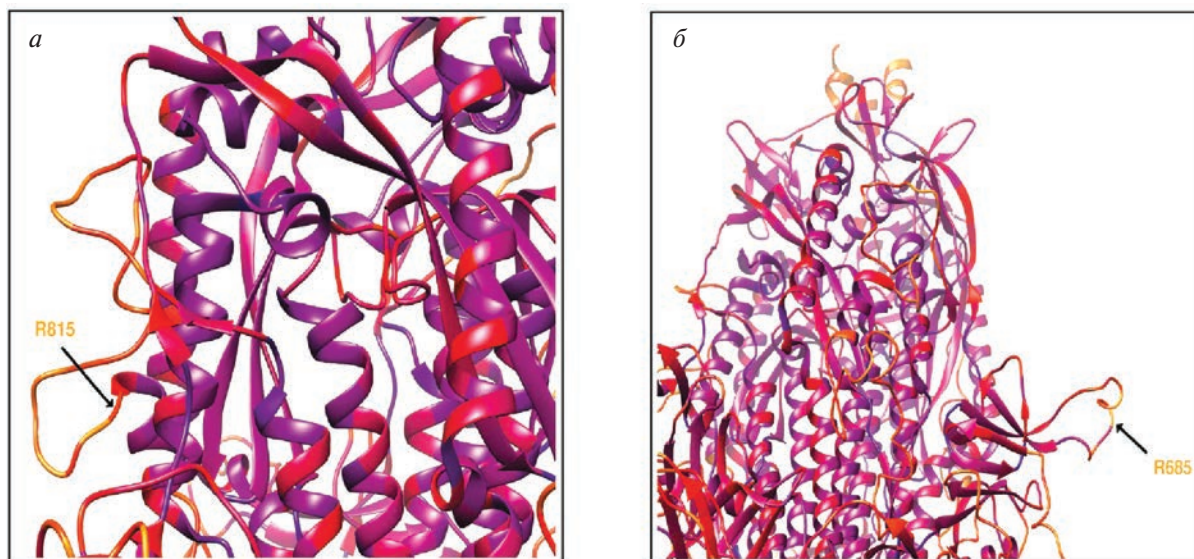
Для предсказания протеолитической активности протеаз человека по отношению к вирусным белкам, помимо использования моделей специфичности протеаз, имеет смысл дополнительно оценивать структурную уязвимость участков исследуемого белка к протеолизу. Соответствующий метод был разработан нами ранее [25] и теперь применен к известным сайтам расщепления S-белка SARS-CoV-2. Используя этот алгоритм, мы дали оценку подверженности протеолизу участков трехмерных структур S-белка в “открытой” и “закрытой” конфор-



**Рис. 1.** Оценка протеолитической эффективности протеаз человека относительно сайтов S-гликопротеина SARS-CoV-2. Протеолитические ферменты человека с наивысшими значениями CS в позиции R815 сайта S2' (а) и в позиции R685 сайта S1/S2 (б). Распределение значений CS для известных протеолитических сайтов и случайно выбранных позиций (в).

мазиях, а также в комплексе с ACE2 (рис. 2а,б; табл. S1 Дополнительных материалов, см. на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Matveev\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Matveev_rus.zip)). Предварительно для каждой субъединицы тримера S-гликопротеина нами были смоделированы все неструктурированные участки белка, в том числе отсутствующая на структурах позиция R685. После получения оценок для каждой позиции каждой субъединицы полученные значения усредняли по всем трем субъединицам тримера. Для удобства анализа позиции в белке были отсортированы по убыванию усредненных оценок. В результате применения метода к 3D-структуре S-гликопротеина в “закрытой” конформации (PDB ID: 6VXX) для позиции S1/S2 была получена оценка 0.77, что указывает на ее высокую доступность для протеолиза: занимает пятую строчку в таблице значений для 1121 исследованной позиции. Для по-

зиции сайта S2' была получена оценка 0.58, что соответствует средней доступности сайта. Аналогично применение метода к 3D-структуре S-белка в “открытой” конформации (PDB ID: 6VYB) дало оценку 0.72 для сайта S1/S2, что также соответствует хорошей доступности для протеолиза – 15 строчка в таблице с 1121 позицией. Для позиции сайта S2' была получена оценка 0.58. Наконец, при применении метода к комплексу S-белка с рецептором ACE2 (PDB ID: 7DF4) для позиции сайта S1/S2 была получена оценка 0.73, а для позиции сайта S2' – 0.67, что уже соответствует хорошей доступности для протеолиза. Полученные результаты соответствуют текущим представлениям о том, что сайт S2' становится доступным для протеазы TMPRSS2 после связывания S-гликопротеина с клеточным рецептором ACE2, а сайт S1/S2 доступен при любой конформации S-белка [5].



**Рис. 2.** Оценка протеолитической доступности сайтов S-гликопротеина SARS-CoV-2. *а* – Отображение на структуре S-гликопротеина (PDB ID: 6VXX) оценок протеолитической доступности в области сайта S2' (позиция R815). *б* – Отображение на структуре S-гликопротеина оценок протеолитической доступности в области сайта S1/S2 (позиция R685). Цветовой градиент от синего к красному и далее к желтому соответствует изменениям от минимальной оценки протеолитической доступности, равной 0, к максимальной, равной 1.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы представили биоинформатический метод идентификации протеаз человека, способных к протеолитическому расщеплению гликопротеинов оболочки вирусов. Идея предлагаемого подхода заключается в вычислении оценок протеолитической эффективности (CS) для пептидных связей белка с использованием модели специфичности протеаз человека и применении разработанного нами ранее метода оценки структурной уязвимости участков белка к протеолизу. Теперь мы разработали модели специфичности протеолитических ферментов к аминокислотной последовательности на основе известных субстратов для 169 протеаз человека. Предлагаемый подход применен к S-белку SARS-CoV-2 штамма Wuhan. В результате разработанный метод прошел успешную валидацию. Так, применив модели специфичности протеаз к аминокислотной последовательности, мы идентифицировали протеазы фурина и TMPRSS2 как характеризующиеся наивысшими значениями CS для сайтов S1/S2 и S2' соответственно. Применив метод предсказания уязвимости участков белка к протеолизу на основе анализа трехмерной структуры S-белка, мы убедились в доступности известных сайтов протеолиза этого вирусного гликопротеина для протеаз. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследований сайтов протеолиза S-гликопротеина SARS-CoV-2 [5]. Представленный метод, разработанный для решения задачи поиска протеаз, активных относительно бел-

ков оболочки вирусов, может применяться для идентификации субстратов и активных в их отношении протеаз, задействованных в любых клеточных процессах, связанных с протеолитической регуляцией, – например, таких как передача сигнала в клетке, коагуляция и апоптоз.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60066.

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Разработанный метод находится в свободном доступе по адресу: <https://github.com/KazanovLab/ProteaseSpecificityModels>

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramage H., Cherry S. (2015) Virus-host interactions: from unbiased genetic screens to function. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 497–524. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055238
2. Li G., Hilgenfeld R., Whitley R., De Clercq E. (2023) Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **22**, 449–475. doi: 10.1038/s41573-023-00672-y
3. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 155–170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6



4. Baggen J., Vanstreels E., Jansen S., Daelemans D. (2021) Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat. Microbiol.* **6**, 1219–1232. doi: 10.1038/s41564-021-00958-0
5. Takeda M. (2022) Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiol. Immunol.* **66**, 15–23. doi: 10.1111/1348-0421.12945
6. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. (2022) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 3–20. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x
7. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* **181**, 281–292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
8. Zabiegala A., Kim Y., Chang K.O. (2023) Roles of host proteases in the entry of SARS-CoV-2. *Anim. Dis.* **3**(1), 12. doi: 10.1186/s44149-023-00075-x
9. Benton D.J., Wrobel A.G., Xu P., Roustan C., Martin S.R., Rosenthal P.B., Skehel J.J., Gamblin S.J. (2020) Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature.* **588**, 327–330. doi: 10.1038/s41586-020-2772-0
10. Matsuyama S., Nao N., Shirato K., Kawase M., Saito S., Takayama I., Nagata N., Sekizuka T., Kato H., Kato F., Sakata M., Tahara M., Kutsuna S., Ohmagari N., Kuroda M., Suzuki T., Kageyama T., Takeda M. (2020) Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 7001–7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117
11. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 11727–11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117
12. Callaway E. (2020) The coronavirus is mutating — does it matter? *Nature.* **585**, 174–177. doi: 10.1038/d41586-020-02544-6
13. Lubinski B., Whittaker G.R. (2023) The SARS-CoV-2 furin cleavage site: natural selection or smoking gun? *Lancet Microbe.* **4**(8), e570. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00144-1
14. Whittaker G.R. (2021) SARS-CoV-2 spike and its adaptable furin cleavage site. *Lancet Microbe.* **2**(10), e488–e489. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00174-9
15. Wu Y., Zhao S. (2021) Furin cleavage sites naturally occur in coronaviruses. *Stem Cell Res.* **50**, 102–115. doi: 10.1016/j.scr.2020.102115
16. Chan Y.A., Zhan S.H. (2021) The emergence of the spike furin cleavage site in SARS-CoV-2. *Mol. Biol. Evol.* **39**(1), msab327. doi: 10.1093/molbev/msab327
17. Whittaker G.R., Daniel S., Millet J.K. (2021) Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2. *Curr. Opin. Virol.* **47**, 113–120. doi: 10.1016/j.coviro.2021.02.006
18. Liu Z., Zheng H., Yuan R., Li M., Lin H., Peng J., Xiong Q., Sun J., Li B., Wu J., Ke C., Hulswit R.J.G., Bowden T.A., Rambaut A., Pybus O.G., Loman N., Lu J. (2020) Identification of common deletions in the spike protein of SARS-CoV-2. *J. Virol.* **94**, e00790-20. doi: 10.1128/JVI.00790-20
19. Park J.E., Li K., Barlan A., Fehr A.R., Perlman S., McCray P.B., Gallagher T. (2016) Proteolytic processing of middle east respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 12262–12267. doi: 10.1073/pnas.1608147113
20. Baggen J., Jacquemyn M., Persoons L., Vanstreels E., Pye V.E., Wrobel A.G., Calvaresi V., Martin S.R., Roustan C., Cronin N.B., Reading E., Thibault H.J., Vercruyse T., Maes P., De Smet F., Yee A., Nivitchanyong T., Roell M., Franco-Hernandez N., Rhinn H., Mamchak A.A. Young-Chapon M.A., Brown E., Cherepanov P., Daelemans D. (2023) TMEM106B is a receptor mediating ACE2-independent SARS-CoV-2 cell entry. *Cell.* **186**, 3427–3442. doi: 10.1016/j.cell.2023.06.005
21. Meng B., Abdullahi A., Ferreira I.A.T.M., Goonawardane N., Saito A., Kimura I., Yamashita D., Gerber P.P., Fatihi S., Rathore S., Zepeda S.K., Papa G., Kemp S.A., Ikeda T., Toyoda M., Tan T.S., Kuramochi J., Mitsunaga S., Ueno T., Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Brevini T., Mallery D.L., Charles O.J., CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration, Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Ecuador-COVID19 Consortium, Bowen, J. E., Joshi A., Walls A.C., Jackson L., Martin D., Smith K.G.C., Bradley J., Briggs J.A.G., Choi J., Madsisson E., Meyer K.B., Mlcochova P., Ceron-Gutierrez L., Doffinger R., Teichmann S.A., Fisher A.J., Pizzuto M.S., de Marco A., Corti D., Hosmillo M., Lee J.H., James L.C. Thukral L., Veesler D., Sigal A., Sampaziotis F., Goodfellow I.G., Matheson N.J., Sato K., Gupta R.K. (2022) Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature.* **603**, 706–714. doi: 10.1038/s41586-022-04474-x
22. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632. doi: 10.1093/nar/gkx1134
23. Wasserman W.W., Sandelin A. (2004) Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 276–287. doi: 10.1038/nrg1315
24. Schechter I., Berger A. (1968) On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain, specific peptide inhibitors of papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 898–902. doi: 10.1016/0006-291x(68)90326-4
25. Matveev E.V., Safronov V.V., Ponomarev G.V., Kazanov M.D. (2023) Predicting structural susceptibility of proteins to proteolytic processing. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 10761. doi: 10.3390/ijms241310761
26. Igarashi Y., Eroshkin A., Gramatikova S., Gramatikoff K., Zhang Y., Smith J.W., Osterman A.L., Godzik A. (2007) CutDB: a proteolytic event data-

- base. *Nucleic Acids Res.* **35**(Database issue), D546–9. doi: 10.1093/nar/gkl813
27. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Prettenhofer P., Weiss R., Dubourg V., Vanderplas J., Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay E., Louppe G. (2011) Scikit-Learn: machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **12**, 2825–2830. doi:10.48550/arXiv.1201.0490
28. The UniProt Consortium (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2699. doi: 10.1093/nar/gky092
29. wwPDB consortium (2019) Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D520–D528. doi: 10.1093/nar/gky949
30. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., De Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwelde T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427
31. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S.A. (2020) Multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell.* **78**, 779–784.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022

## A Bioinformatics Method for Identification of Human Proteases Active against Viral Envelope Glycoproteins: A Case Study on the SARS-CoV-2 Spike Protein

E. V. Matveev<sup>1, 2, 3</sup>, G. V. Ponomarev<sup>1, 2</sup>, and M. D. Kazanov<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

<sup>2</sup> Kharkevich Institute for Information Transmission Problem, Moscow, 127051 Russia

<sup>3</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: mkazanov@gmail.com

Many viruses, including SARS-CoV-2, the coronavirus responsible for the COVID-19 pandemic, enter host cells through a process cell-viral membrane fusion that is activated by proteolytic enzymes. Typically, these enzymes are host cell proteases. Identifying the proteases that activate the virus is not a simple task but is important for the development of new antiviral drugs. In this study, we developed a bioinformatics method for identifying proteases that can cleave viral envelope glycoproteins. The proposed approach involves the use of predictive models for the substrate specificity of human proteases and the application of structural analysis method for predicting the vulnerability of protein regions to proteolysis based on their 3D structures. Specificity models were constructed for 169 human proteases using information on their known substrates. A previously developed method for structural analysis of potential proteolysis sites was applied in parallel with specificity models. Validation of the proposed approach was performed on the SARS-CoV-2 spike protein, the proteolysis sites of which had been well studied.

**Keywords:** human proteases, virus glycoprotein, proteolytic activation, spike protein, SARS-CoV-2

## ПРОТЕОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *Bacillus pumilus* 3-19

© 2024 г. У. Курди<sup>а</sup>, П. В. Зеленихин<sup>а</sup>, Г. Ю. Яковлева<sup>а</sup>, М. Н. Синягина<sup>а</sup>,  
А. И. Колпаков<sup>а</sup>, О. Н. Ильинская<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: [Ilinskaya\\_kfu@mail.ru](mailto:Ilinskaya_kfu@mail.ru)

Поступила в редакцию 01.08.2023 г.

После доработки 06.09.2023 г.

Принята к публикации 07.09.2023 г.

Внеклеточные мембранные везикулы являются важным фактором коммуникации в бактериальных популяциях и при взаимодействии бактерий с хозяином. Везикулы как носители различных регуляторных и сигнальных молекул обуславливают возможность их использования в качестве биомаркеров заболеваний и перспективных терапевтических агентов, в том числе вакцинных препаратов. Состав мембранных везикул расшифрован у ограниченного числа грамотрицательных и грамположительных бактерий. В данной работе впервые выделены, визуализированы и охарактеризованы внеклеточные мембранные везикулы стрептомициноустойчивого штамма *Bacillus pumilus* 3-19, продуцента внеклеточной гуанилпредпочитающей рибонуклеазы – биназы. Установлено, что в везикулах отсутствует генетический материал, а спектр белков зависит от содержания фосфата в среде культивирования. Везикулы, продуцируемые бактериями, которые росли на среде с дефицитом фосфата, несут 49 уникальных белков, на среде с высоким содержанием фосфата – 101 белок. Оба типа везикул включают 140 общих белков. В везикулах идентифицированы флагеллярные белки, РНКазы J – основной фермент РНК-деградосомы, фосфатазы, пептидазы, транспортеры железа, сигнальные пептиды. Белки антибиотикорезистентности и амилоидоподобные белки, которые присутствуют в клетках *B. pumilus* 3-19, в везикулах не обнаружены. Биназа, индуцируемая дефицитом фосфата, обнаружена только в составе везикул, полученных на среде с дефицитом фосфата.

**Ключевые слова:** внеклеточные мембранные везикулы, *Bacillus pumilus*, геном, протеом, РНКазы, биназа, флагеллярные белки, амилоидоподобные белки

DOI: 10.31857/S0026898424010186, EDN: NRBQXZ

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство бактерий обладают способностью продуцировать сферические мембранные наночастицы диаметром от 20 до 400 нм, называемые мембранными везикулами (МВ). МВ содержат различные молекулы и выполняют определенные функции, включая транспорт факторов вирулентности, перенос ДНК, перехват бактериофагов, антибиотиков и эукариотических факторов защиты хозяина, детоксикацию клеток и коммуникацию бактерий [1]. Впервые МВ, образующиеся путем вздутия и пузырения (блеbbing) внешней мембраны, были обнаружены у грамотрицательных бактерий. Недавно описаны везикулы грамотрицательных бактерий, формирующиеся из обеих мембран (наружной и вну-

тренней) в результате запускаемого эндолизином лизиса клеток [2]. Грамположительные бактерии также секретируют везикулы, которые образуются из цитоплазматической мембраны, однако их изучение было начато позднее, поскольку значительный слой муреина в клеточной стенке этих бактерий обуславливает низкую продукцию МВ [3].

Исследование состава МВ представляет значительный интерес, поскольку раскрывает особенности взаимодействия между бактериальными клетками, а также взаимодействия бактерий с клетками эукариотических организмов, в том числе и в системе патоген–хозяин. В состав везикул входят не только компоненты внешней мембраны – липополисахариды, фосфолипиды, белки, но и белки периплазмы, некоторые цитоплазматические ферменты и нуклеиновые кислоты. Вариабельный состав МВ свидетельствует о еще нераскрытом потенциале их практического использования, в частности в качестве новых

Сокращения: МВ – мембранные везикулы; LPM – среда с низким содержанием фосфата; НРМ – среда с высоким содержанием фосфата.

биомаркеров заболеваний, а также для создания неклеточных вакцин.

Расшифрован протеомный состав МВ грамотрицательных бактерий *Bacteroides thetaiotaomicron* [4], *Fusobacterium nucleatum* [5], *Haemophilus parasuis* [6], *Burkholderia multivorans* [7]. Методами синтетической биологии создан штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)Δ60, продуцирующий МВ с минимизированным протеомом, лишенным 59 эндогенных белков способный нести до 30% рекомбинантных белков как базовый штамм для получения новых вакцинных препаратов [8].

Проведен анализ протеома везикул таких грамположительных бактерий, как *Staphylococcus aureus* [9, 10], *Streptococcus pneumoniae* [11], *Bacillus subtilis* [12], *Granulicatella adiacens* [13].

*B. pumilus* – известный продуцент внеклеточной рибонуклеазы (РНказы), которая обладает противоопухолевыми [14–16] и противовирусными свойствами [17–20]. Продукция МВ и их состав у этой бактерии неизвестны.

В настоящей работе подтверждена возможность образования МВ стрептомицинустойчивым штаммом *B. pumilus* 3-19 и проанализирован состав этих МВ. В особую задачу выделено сравнение протеомов МВ, продуцируемых на средах с высоким и низким содержанием фосфора, поскольку дефицит фосфата индуцирует биосинтез внеклеточных РНКаз бациллами [21], получение которых имеет практическую значимость для терапевтических нужд. Принципиальное фундаментальное значение имеет также решение вопроса переноса генов и белков антибиотикорезистентности в составе МВ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штамм и условия культивирования.** Штамм *B. pumilus* 3-19 (GenBank № HQ650161.1; ВКПМ В-9862) поддерживали на агаризованной среде Лурия–Бертани; для анализа везикул клетки высевали на глюкозо-пептонные среды (два варианта) состава (г/л): пептон – 20.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.3,  $\text{NaCl}$  – 3.0, глюкоза – 10.0 (рН 8.4–8.5). В состав среды с низким содержанием фосфата (LPM) входил пептон Семипалатинский (Россия), с высоким (HPM) – пептон компании “Пан-Эко” (Россия). Штамм для получения МВ культивировали до достижения логарифмической фазы ( $OD_{600} > 2.0$ ).

**Определение концентрации фосфора в среде.** Содержание фосфора в среде определяли колориметрически по образованию фосфорно-молибденовой сини после добавления к 1 мл сре-

ды 0.8 мл раствора молибдата натрия (1.8%-ный в 2.5 Н серной кислоте) и 0.2 мл хлорида олова (0.4%-ный в концентрированной соляной кислоте) [22]. Колориметрирование проводили на КФК-2 при длине волны 670 нм. Содержание фосфора в среде определяли по формуле: фосфор (мкг/мл) =  $C \times P$ , где  $C$  – концентрация фосфата, найденная по калибровочной кривой,  $P$  – разведение. В качестве стандартного раствора использовали однозамещенный фосфат калия, содержащий 0.1 мг фосфора в 1 мл.

**Выделение и очистка внеклеточных везикул (МВ).** МВ выделяли согласно алгоритму, разработанному для грамположительных бактерий [9, 12]. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 20 мин, после чего супернатант фильтровали через стерильный ацетат-целлюлозный фильтр Minisart (“Sartorius Stedim Biotech GmbH,” Германия) с размером пор 100 нм. Стерильный фильтрат концентрировали в 20 раз с помощью концентратора Vivacell 100 (“Sartorius Stedim Biotech GmbH”). Везикулы осаждали ультрацентрифугированием (100 000 g, 2 ч, 8°C) с использованием ротора MLA-80 (“Beckman Coulter Optima™” MAX-E), осадок суспендировали в буфере (50 mM Трис-НСl рН 7.4, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Полученную суспензию везикул наслаивали на ступенчатый градиент 10–20–40% Optiprep (“Sigma”, США) и разделяли с помощью ультрацентрифугирования. Фракции везикул двукратно промывали в буфере (50 mM Трис-НСl, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$  рН 7.4) и снова осаждали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в буфере с добавлением 1 mM PMSF (“Fluka”, Германия). Отсутствие в исследуемом препарате везикул примесей клеток проверяли микроскопированием и высевом на агаризованную среду LB.

**Выделение и очистка ДНК.** Суммарную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной обработкой образцов ДНКазой I и протеиназой K. Количество выделенной ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit 2.0 (“Invitrogen”, США).

**Секвенирование ДНК.** ДНК для секвенирования на приборе Illumina Miseq фрагментировали, используя ультразвуковой фрагментатор Covaris S220 (“Covaris”, США), после чего проводили подготовку ДНК-библиотек с помощью коммерческого набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep kit for Illumina (“NEB”, США). Для количественной оценки библиотек использовали флуориметр Qubit 2.0 (“Invitrogen”). Качество библиотек оценивали на чипах High Sensitivity, 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США).

Полученные риды картировали на сборку генома *B. pumilus* 3-19 (GenBank № HQ650161.1)

с помощью Bowtie2 и подсчитывали, используя программу featureCounts [23].

**Протеомный анализ везикул.** Протеомное профилирование МВ проводили с помощью LC/ESI-MS/MS. Белки МВ растворяли в буфере (25 мМ Трис-НСl pH 6.8, 5% глицерина, 0.05% бромфенолового синего, 1% SDS; 50 мМ ДТТ), центрифугировали (12 000 g, 10 мин) и отбирали супернатант, содержащий белки.

Белки разделяли с помощью одномерного электрофореза в 12%-ном полиакриламидом геле и окрашивали с помощью Кумасси G-250. Фракции белков вырезали из геля и отмывали в ddiH<sub>2</sub>O (15 мин) и смеси ацетонитрил: 200 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 : 1) при 50°C в течение 30 мин. К гелю добавляли рабочий раствор трипсина (“Promega”, США). Трипсинолиз проводили при 37°C в течение ночи. Для экстракции пептидов из геля в каждую пробирку добавляли по 20 мкл 0.5%-ного раствора ТФУ и инкубировали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Продукты трипсинолиза очищали на колонках (Pierce C18 Tips, “Thermo Fisher”) согласно инструкции фирмы-изготовителя и высушивали на центрифужном испарителе (“Eppendorf”, Германия).

Белки МВ идентифицировали с помощью хромато-масс-спектрометрии. Спектры получали на приборе Maxis Impact (“Bruker”, Германия), укомплектованном системой для ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 Series (“Thermo Fisher Scientific”, США). Образцы растворяли в смеси метанола (1%), муравьиной кислоты (0.1%) и воды (98.9%) (об/об), наносили на колонку Acclaim PepMap RSLC (“Thermo Fisher Scientific”) и элюировали в течение 3 ч, увеличивая содержание смеси ацетонитрила (99.9%) и муравьиной кислоты (0.1%) с 2 до 60%.

Масс-спектры (MS1) получали при следующих параметрах: детекция молекулярных ионов в диапазоне 300–2000 m/z, время накопления сигнала 250 мс. Для получения спектров MS2 выбирали ионы с соотношением сигнал/шум не менее 400 и зарядом от 2 до 5. Детекцию ионов проводили в диапазоне 200–2000 m/z, время накопления сигнала 50 мс для каждого родительского иона. Точность измерения составляла 0.6 Да. Полученные MS/MS-спектры анализировали с использованием программы MASCOT (“Matrix Science, Inc.”). Идентификацию белка считали надежной при обнаружении минимум двух разных по аминокислотной последовательности пептидов со значением PEPScore  $\geq$  14.

**Атомно-силовая микроскопия.** Образцы клеточных культур, сконцентрированные центрифугированием (5000 g, 15 мин), наносили на предметное стекло и высушивали при ком-

натной температуре. Визуализацию бактерий проводили на воздухе при комнатной температуре и постоянной влажности в полуконтактном и контактном режимах на атомно-силовом микроскопе Solver P47H (“НТ-МДТ”, Россия) [24]. Использовали стандартные кремниевые кантилеверы, радиус кривизны острия которых не превышал 10 нм. Сканирование производили с разрешением 512  $\times$  512 пикселей.

**Трансмиссионная электронная микроскопия.** Образцы подготавливали стандартным методом [25]. Везикулы фиксировали в течение 16 ч в растворе 2.5%-го глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.2–7.4 при 4°C, центрифугировали при 35 000 g (8°C, 70 мин), насыщали парами 1% OsO<sub>4</sub>, для обезвоживания промывали осадок спиртом и ацетоном. К осадку добавляли окись пропилена, инкубировали в течение 30 мин, далее осадок пропитывали эпоновой смолой. Блоки, полученные после полимеризации, нарезали и проводили трансмиссионную электронную микроскопию (микроскоп JEM-100 CX, Япония).

**Статистика и биоинформатика.** Для предсказания субклеточной локализации белков из МВ бактерий, выращенных на LPM и НРМ, использовали их аминокислотные последовательности и программное обеспечение PSORTb v3.0.3, доступное онлайн на <https://www.psort.org/psortb/> [26]. Последовательности использовали также для присвоения белкам номера К (КО) и для их функциональных аннотаций с применением программного обеспечения BlastKOALA на сайте KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) [27]. Microsoft Excel 2019 из пакета Microsoft Office использовали для расчета кратности и статистической значимости изменений между белками МВ бактерий, выращенных на LPM и НРМ, с целью их последующего графического представления в соответствии с программным обеспечением VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR/>) [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Образование и характеристика МВ*

В условиях фосфатного голодания в бактериях активируется синтез внеклеточных гуанил-предпочитающих РНКаз, что подтверждает участие этих ферментов в извлечении питательных веществ из труднодоступных субстратов [20]. Для выявления возможной секреции РНКаз в составе МВ мы выбрали два варианта сред культивирования бактерий: НРМ, в которой содержание фосфора составляло  $82 \pm 8$  мкг/мл, и LPM, содержащей  $20 \pm 2$  мкг/мл фосфо-

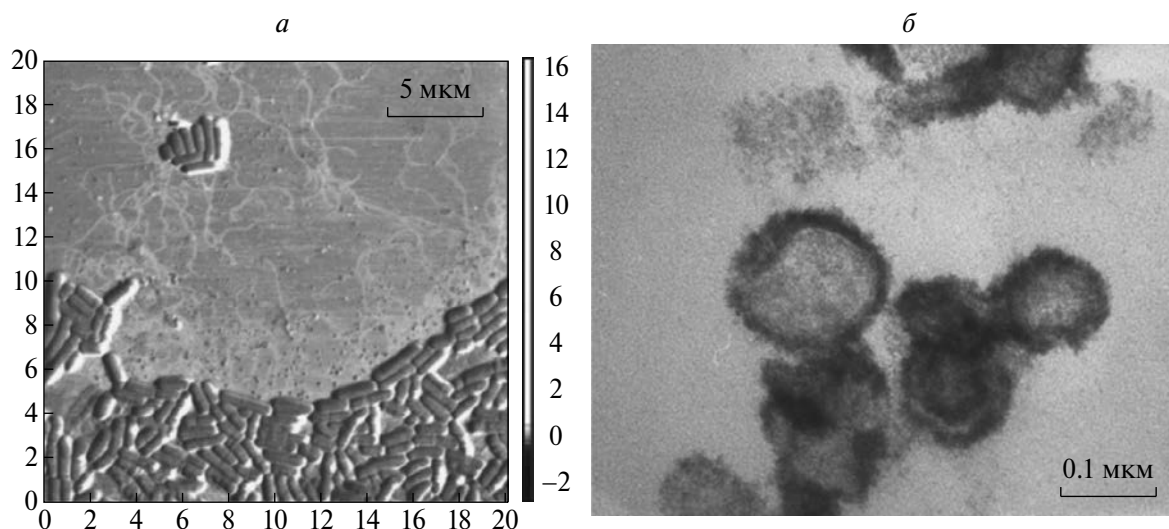


Рис. 1. Визуализация внеклеточных везикул *Bacillus pumilus* 3-19 с помощью атомно-силовой (а) и трансмиссионной электронной (б) микроскопии.

ра, учитывая, что на среде НРМ практически отсутствует секреция РНКаз. Образование МВ, представляющих собой сферические образования размером 80–120 нм, выявлено при росте бактерий на обеих средах (рис. 1).

Максимальное число генов, идентифицированных у *B. pumilus*, составляет 3679 (GenBank № CP054310.1). Нами секвенированы фрагменты ДНК бактерий, выращенных на среде LPM, и идентифицированы 3507 генов, из которых 686 кодируют гипотетические белки (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp\\_Kurdy\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/1/supp_Kurdy_rus.pdf)). Некоторые различия в числе идентифицированных генов связаны с паттерном метилирования бактериальной ДНК, техническими особенностями процесса секвенирования и несовершенством сборки геномов, варьирующими в зависимости от условий культивирования [29]. Проведено предварительное исследование генома *B. pumilus*, направленное на изучение возможного попадания каких-либо генов в МВ. Ранее считали, что для МВ грамположительных бактерий характерно отсутствие генетического материала [30]. Хотя в последнее время зафиксировано присутствие ДНК в везикулах *Clostridium perfringens* [31], *S. mutans* [32], в МВ *B. subtilis* ДНК не обнаружена [12]. Во фракциях везикул *B. pumilus* 3-19 нам также не удалось обнаружить ДНК. Таким образом, МВ *B. pumilus* 3-19 представляют собой липопротеидные комплексы, не участвующие в переносе ДНК.

#### Функциональный анализ протеома МВ

Протеомный анализ везикул *B. pumilus*, выращенных на среде LPM, выявил в них 189 бел-

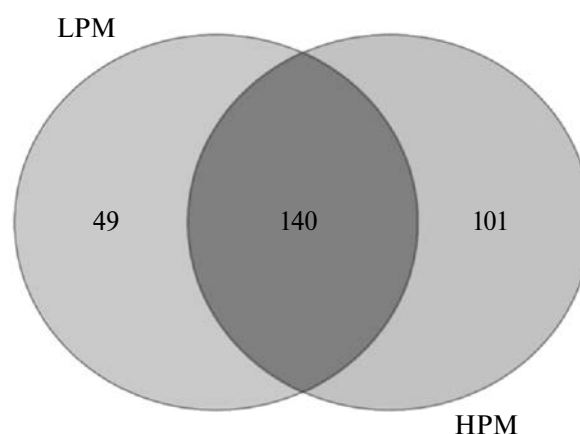


Рис. 2. Диаграмма Венна, показывающая количество белков в везикулах, полученных при культивировании *B. pumilus* 3-19 на средах LPM и НРМ.

ков. В протеоме везикул бактерий, выращенных на НРМ, обнаружен 241 белок. Как видно из диаграммы Венна, везикулы обоих типов содержат 140 общих белков (табл. S2, см. Дополнительные материалы).

Идентифицированные белки были распределены по функциональным группам с помощью BLAST-анализа. Установлено, что в везикулах из клеток, росших на среде LPM, увеличено количество белков, функции которых связаны с биосинтезом и метаболизмом липидов, аминокислот, гликанов, а также обработкой генетической информации и информации об окружающей среде. Доля белков, участвующих в энергетическом и углеводном обменах, напротив, понижена (рис. 3).

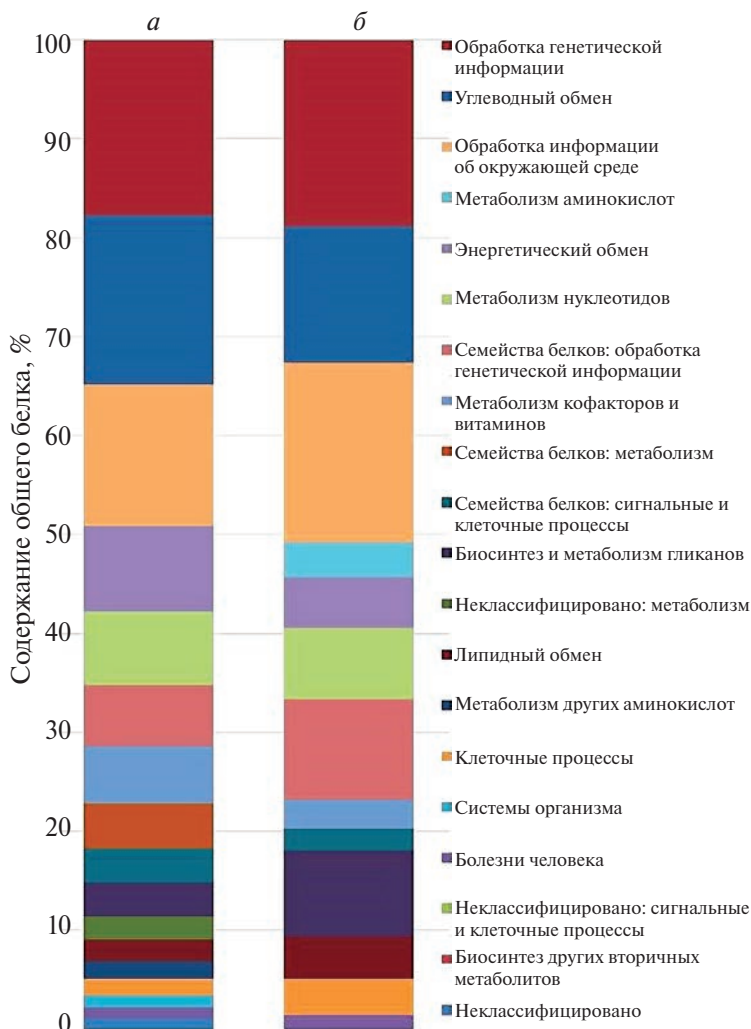


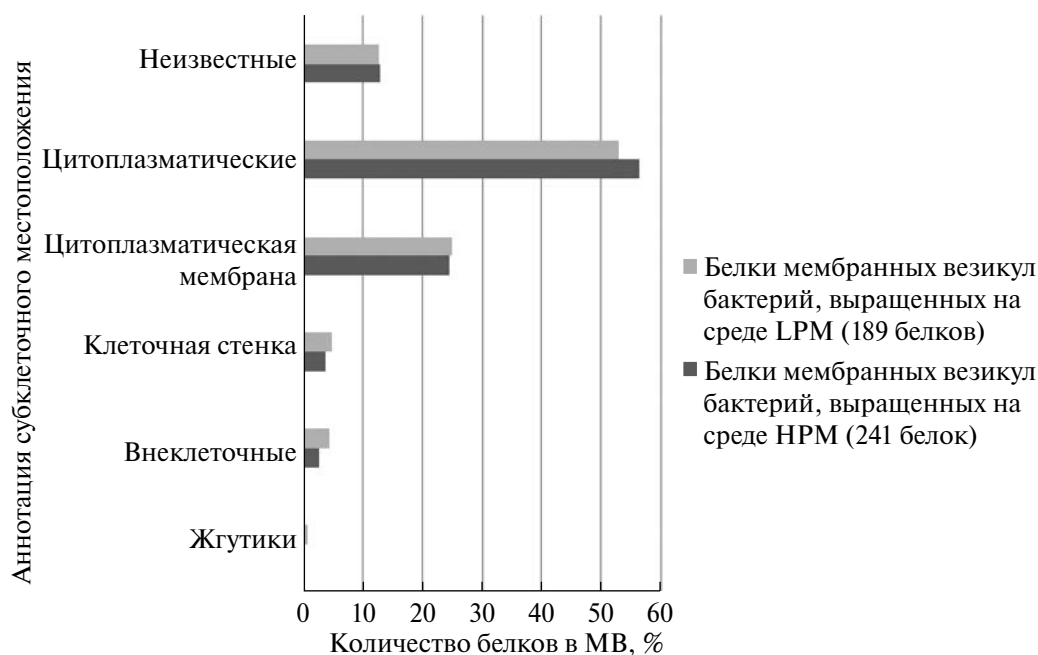
Рис. 3. Группы белков с известными функциями в мембранных везикулах *B. pumilus* 3-19, полученных при культивировании штамма на средах НРМ (а) и LPM (б) (программное обеспечение BlastKOALA).

Анализ локализации белков показал, что везикулы бактерий, выращенных на среде LPM, включают больше белков, аннотированных как внеклеточные и связанные с цитоплазматической мембраной по сравнению с везикулами с НРМ, которые содержат больше цитоплазматических белков (рис. 4).

В везикулах бактерий, культивируемых на среде LPM, обнаружена РНКаза (№ 34 в табл. S2, см. Дополнительные материалы). Как показал BLAST-анализ, аминокислотная последовательность этого белка полностью идентична последовательности внеклеточной РНКазы — биназы (GenBank № CAA37735.1). В везикулах бактерий, росших на среде НРМ, этот белок отсутствует. Таким образом, нами впервые показано, что на среде с низким содержанием фосфора *B. pumilus* 3-19 секретирует биназу в составе МВ (рис. 5а).

РНКаза J, основной фермент РНК-деградосомы, играет существенную роль в глобальном распаде мРНК. Этот фермент идентифицирован в составе МВ, продуцируемых клетками, растущими как на среде LPM, так и НРМ (рис. 5а).

Многие бациллы используют для ограниченного движения (скольжения) на влажных агаровых поверхностях нитевидные выросты — фимбри (пили). Отдельные клетки в популяциях двигаются со скоростью от 76 до 116 мкм/с [33]. Переход от подвижности к формированию биопленки включает ингибирование транскрипции генов фимбрий; в отсутствие синтеза *de novo* фимбрий исчезают, что сопровождается стабилизацией биопленки [34]. Мы выращивали бактерии на жидкой среде, где биопленка не образовывалась, и смогли визуализировать фимбри с помощью атомно-силовой микроскопии (рис. 1а).



**Рис. 4.** Локализация белков мембранных везикул *B. pumilus* 3-19, выращенных на средах LPM и НРМ (программное обеспечение PSORTb v3.0.3). За 100% принято количество белков в везикулах каждой фракции.

Белки фимбрий обнаружены нами в составе МВ *B. pumilus*. Поскольку эти белки присутствуют у подвижных жгутиковых бактерий, их относят к флагеллярным. В геноме *B. pumilus* 3-19 присутствуют 33 гена, кодирующих флагеллярные белки. Уровень белка FlgG повышен в МВ бактерий, выращенных на среде LPM, в то время как в везикулах бактерий, выращенных на НРМ, повышен уровень флагеллярного моторного белка MotA. Белки FlgK и флагеллин в МВ обоих типов представлены в равных количествах (рис. 5б).

У бактерий нитчатые структуры входят в состав внеклеточного матрикса, который окружает клетку и тем самым обеспечивает защиту от неблагоприятных условий окружающей среды. Подобные структуры, хорошо изученные у *Enterobacteriaceae* [35], состоят из так называемых функциональных амилоидов или, более корректно, амилоидоподобных белков, имеющих конструктивную функцию в отличие от амилоидных волокон, связанных с заболеваниями. Амилоидоподобные белки вовлечены в формирование биопленок, фимбрий, в адгезию клеток. Эти белки описаны и у грамположительных бактерий *Streptomyces coelicolor* и *B. subtilis* [36].

Амилоидоподобный белок TasA является основным матричным белком в биопленках *B. subtilis* [37, 38]. Нуклеотидные последовательности гена *TasA* идентифицированы у *B. subtilis*, *B. velezensis*, *S. pneumoniae*, а также у *B. pumilus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>

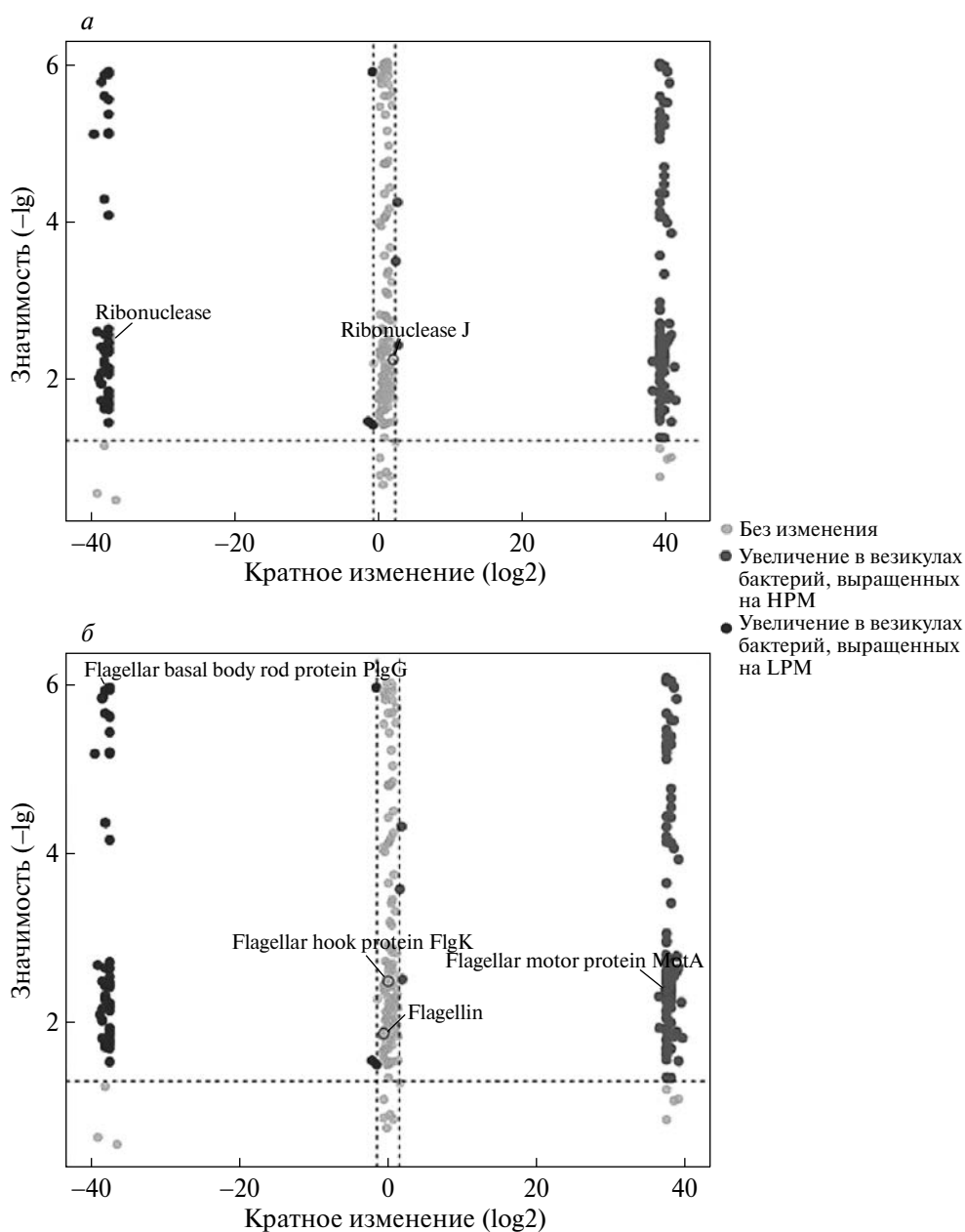
KC576815.1). Анализ генома *B. pumilus* 3-19 выявил в нем ген амилоидоподобного белка TapA (№ 2767, amyloid fiber anchoring/assembly protein, табл. S1, см. Дополнительные материалы), который служит праймером для олигомеризации TasA. Однако в состав везикул этот белок не входит.

Таким образом, в настоящей работе впервые зафиксировано образование внеклеточных МВ *B. pumilus* 3-19 и определен их состав. Установлено, что МВ не содержат генетического материала и различаются спектром белков, который зависит от содержания фосфата в среде культивирования штамма. МВ несут 140 общих белков; 49 уникальных белков идентифицировано в везикулах клеток, росших на среде LPM, и 101 — на среде НРМ. В везикулах обнаружены флагеллярные белки и не найдены белки антибиотикорезистентности и амилоидоподобные белки, гены которых присутствуют в клетках *B. pumilus* 3-19. Оба типа везикул содержат РНКазу J, основной фермент РНК-деградосомы. Секретируемая РНКаза — биназа, синтез которой индуцируется дефицитом фосфата, входит в состав МВ клеток, культивируемых на среде LPM, но не НРМ.

Авторы благодарят директора Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ Т.В. Григорьеву за помощь в работе.

Работа выполнена в рамках программы «Приоритет-2030» и поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-24-00036).





**Рис. 5.** Сравнение содержания белков (*a* – РНКаз, *б* – флагеллярных) в МВ *V. pumilus* 3-19, культивируемых на средах LPM и НРМ (программное обеспечение VolcaNoseR).

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

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. (2019) Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 13–24.
2. Vitse J., Devreese B. (2020) The contribution of membrane vesicles to bacterial pathogenicity in cystic fibrosis infections and healthcare associated pneumonia. *Front. Microbiol.* **11**, 630.
3. Cao Y., Lin H. (2021) Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**(5), 1795–1801.
4. Stentz R., Jones E., Juodeikis R., Wegmann U., Guirro M., Goldson A.J., Brion A., Booth C., Sudhakar P., Brown I.R., Korcsmáros T., Carding S.R. (2022) The proteome of extracellular vesicles produced by the human gut bacteria *Bacteroides thetaio-*

- taomicron in vivo* is influenced by environmental and host-derived factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**(16), e0053322.
5. Liu J., Hsieh C.L., Gelincik O., Devolder B., Sei S., Zhang S., Lipkin S.M., Chang Y.F. (2019) Proteomic characterization of outer membrane vesicles from gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum*. *J. Proteomics.* **195**, 125–137.
  6. Zhang K., Chu P., Song S., Yang D., Bian Z., Li Y., Gou H., Jiang Z., Cai R., Li C. (2021) Proteome analysis of outer membrane vesicles from a highly virulent strain of *Haemophilus parasuis*. *Front. Vet. Sci.* **8**, 756764.
  7. Terán L.C., Distefano M., Bellich B., Petrosino S., Bertoncin P., Cescutti P., Sblattero D. (2020) Proteomic studies of the biofilm matrix including outer membrane vesicles of *Burkholderia multivorans* C1576, a strain of clinical importance for cystic fibrosis. *Microorganisms.* **8**(11), 1826.
  8. Zanella I., König E. Tomasi M., Gagliardi A., Frattini L., Fantappiè L., Irene C., Zerbini F., Caproni E., Isaac S.J., Grigolato M., Corbellari R., Valensin S., Ferlenghi I., Giusti F., Bini L., Ashhab Y., Grandi A., Grandi G. (2021) Proteome-minimized outer membrane vesicles from *Escherichia coli* as a generalized vaccine platform. *J. Extracell. Vesicles.* **10**(4), e12066.
  9. Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics.* **9**(24), 5425–5436.
  10. Bitto N.J., Cheng L., Johnston E.L., Pathirana R., Phan T.K., Poon I.K.H., O'Brien-Simpson N.M., Hill A.F., Stinear T.P., Kaparakis-Liaskos M. (2021) *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy. *J. Extracell. Vesicles.* **10**(6), e12080.
  11. Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J., Martín-Peña R., González-Reyes J.A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Fernández J., Luque-García J.L., García-Lidón C., Estévez H., Pachón J., Obando I., Casadevall A., Pirofski L.A., Rodríguez-Ortega M.J. (2014) Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteomics.* **106**, 46–60.
  12. Kim Y., Edwards N., Fenselau C. (2016) Extracellular vesicle proteomes reflect developmental phases of *Bacillus subtilis*. *Clin. Proteomics.* **13**, 6.
  13. Alkandari S.A., Bhardwaj R.G., Ellepola A., Karched M. (2020) Proteomics of extracellular vesicles produced by *Granulicatella adiacens*, which causes infective endocarditis. *PLoS One.* **15**(11), e0227657.
  14. Ilinskaya O.N., Mahmud R.S. (2014) Ribonucleases as antiviral agents. *Mol. Biol.* **48**(5), 615–623.
  15. Shah Mahmud R., Efimova M.A., Ulyanova V., Ravirov R.K., Shuralev E.A., Kolpakov A., Ilinskaya O. (2020) *Bacillus pumilus* ribonuclease rescues mice infected by double-stranded RNA-containing reovirus serotype 1. *Virus Res.* **286**, 198086.
  16. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Laikov A., Dudkina E., Markelova M., Mostafa A., Pleschka S., Ilinskaya O. (2020) Anti-influenza activity of the ribonuclease binase: cellular targets detected by quantitative proteomics. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(21), 8294.
  17. Garipov A.R., Nesmelov A.A., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. (2014) *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Toxicol.* **92**, 54–59.
  18. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie.* **95**(6), 1344–1349.
  19. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**(7 Pt A), 1559–1567.
  20. Faizullin D., Valiullina Y., Salnikov V., Zelenikhin P., Zuev Y., Ilinskaya O. (2023) Fibrin-rhamnogalacturonan i composite gel for therapeutic enzyme delivery to intestinal tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(2), 926.
  21. Харитоновна М.А., Колпаков А.И., Куприянова-Ашина Ф.Г. (2018) Интенсификация продукции секретируемой рибонуклеазы Bsn *Bacillus subtilis* в условиях солевого стресса. *Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. им. Овчинникова.* **14**(2), 42–47.
  22. Аринушкина Е.В. (1970) *Руководство по химическому анализу почв.* Москва: Изд-во МГУ. 218 с.
  23. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* **30**(7), 923–930.
  24. Konovalova O.A., Yakovleva G. Yu., Steryakov O.V., Trushin M.V. (2013) Scanning probe microscopy in the study of morphometric changes and physical parameters of *Escherichia coli* bacteria under the action of 2,4,6-trinitrotoluene. *W. Appl. Sci. J.* **23**(4), 507–509.
  25. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. (2011) Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8. *Sci. World J.* **11**, 1120–1130.
  26. Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R., Melli G., Rey S., Lo R., Dao P., Sahinalp S.C., Ester M., Foster L.J., Brinkman F.S.L. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics.* **26**(13), 1608–1615.
  27. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* **428**, 726–731.
  28. Goedhart J., Luijsterburg M.S. (2020) VolcaNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci. Rep.* **10**, 20560.

29. Adhikari S., Curtis P.D. (2016) DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**(5), 575–591.
30. Dorward D.W., Garon C.F. (1990) DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6), 1960–1962.
31. Jiang Y., Kong Q., Roland K.L., Curtiss R. (2014) Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**(3–4), 431–443.
32. Liao S., Klein M.I., Heim K.P., Fan Y., Bitoun J.P., Ahn S.J., Burne R.A., Koo H., Brady L.J., Wen Z.T. (2014) *Streptococcus mutans* extracellular DNA is up-regulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J. Bacteriol.* **196**(13), 2355–2366.
33. Mendelson N.H., Bourque A., Wilkening K., Anderson K.R., Watkins J.C. (1999) Organized cell swimming motions in *Bacillus subtilis* colonies: patterns of short-lived whirls and jets. *J. Bacteriol.* **181**(2), 600–609.
34. Guttenplan S.B., Kearns D.B. (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**(6), 849–871.
35. Barnhart M.M., Chapman M.R. (2006) Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–147.
36. Dragoš A., Kovács Á.T., Claessen D. (2017) The role of functional amyloids in multicellular growth and development of gram-positive bacteria. *Biomolecules.* **7**(3), 60.
37. Malishev R., Abbasi R., Jelinek R., Chai L. (2018) Bacterial model membranes reshape fibrillation of a functional amyloid protein. *Biochemistry.* **57**(35), 5230–5238.
38. Böhning J., Ghrayeb M., Pedebos C., Abbas D.K., Khalid S., Chai L., Bharat T.A.M. (2022) Donor-strand exchange drives assembly of the Tasa scaffold in *Bacillus subtilis* biofilms. *Nat. Commun.* **13**(1), 7082.

## Proteome of Extracellular Membrane Vesicles from *Bacillus pumilus* 3-19

W. Kurdy<sup>1</sup>, P. V. Zelenikhin<sup>1</sup>, G. Yu. Yakovleva<sup>1</sup>, M. N. Sinyagina<sup>1</sup>, A. I. Kolpakov<sup>1</sup>,  
and O. N. Ilinskaya<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga-Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: Ilinskaya\_kfu@mail.ru

Production of extracellular membrane vesicles plays an important role in communication in bacterial populations and in bacteria - host interaction. Vesicles as carriers of various regulatory and signaling molecules may be potentially used as disease biomarkers and promising therapeutic agents, including vaccine preparations. The composition of membrane vesicles has been deciphered for a limited number of Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this work, for the first time, extracellular membrane vesicles of a streptomycin-resistant strain *Bacillus pumilus* 3-19, a producer of extracellular guanyl-preferring ribonuclease binase, are isolated, visualized, and characterized by their genome and proteome composition. It has been established that there is no genetic material in the vesicles, and the spectrum of proteins differs depending on the phosphate content in the culture medium of the strain. Vesicles from a phosphate-deficient medium carry 49 unique proteins in comparison with 101 from a medium with the high phosphate content. The two types of vesicles had 140 mutual proteins. Flagellar proteins, RNase J – the main enzyme of RNA degradosomes, phosphatases, peptidases, iron transporters, signal peptides, were identified in vesicles. Antibiotic resistance proteins and amyloid-like proteins whose genes are present in *B. pumilus* 3-19 cells are absent. Phosphate deficiency-induced binase was found only in vesicles from a phosphate-deficient medium.

**Keywords:** extracellular membrane vesicles, *Bacillus pumilus*, genome, proteome, RNase, binase, flagellar proteins, amyloid-like proteins