

ISSN 0026-8984

Том 58, Номер 5

Сентябрь–Октябрь 2024



# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

*Российская академия наук*

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Том 58 № 5 2024 Сентябрь–Октябрь

Основан в 1967 году В.А. Энгельгардтом

Выходит 6 раз в год

ISSN: 0026-8984

*Журнал издается под руководством*

*Отделения биологических наук РАН*

**Главный редактор**

А.А. Макаров

**Редакционная коллегия**

А.В. Баранова, В.А. Гвоздев, М.С. Гельфанд, С.Г. Георгиева,

М.Б. Готтих, В.Г. Дебабов, О.А. Донцова,

В.Л. Карпов (*заместитель главного редактора*), С.Н. Кочетков,

Д.В. Купраш, О.И. Лаврик, Д.А. Лось, С.А. Лукьянов, В.А. Митькевич,

А.В. Морозов (*заместитель главного редактора*),

С.А. Недоспасов, В.С. Прасолов, Т.А. Пронина (*ответственный секретарь*),

О.О. Фаворова, А.В. Финкельштейн, П.М. Чумаков

**Редакция**

*Заведующая редакцией И.А. Усанова*

*Редакторы. Е.Ю. Дмитриева, Л.В. Мочалова*

*Выпускающий редактор Е.Ю. Дмитриева*

Журнал включен в библиографические базы данных

Chemical Abstracts (CAS), Index Medicus (Medline), Biological and Agriculture Index,

CAB Abstracts, SCOPUS, Microbiology Abstracts Section B: Health and Safety Science,

Virology and AIDS Abstracts

Телефон редакции: (499) 343-78-07; E-mail: [jrmolbio@gmail.com](mailto:jrmolbio@gmail.com)

Web site: <http://www.molecbio.ru>

**Москва**

**ФГБУ «Издательство «Наука»**

# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 58, номер 5, 2024

---

## СТАРЕНИЕ И ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

(редактор-составитель раздела – А. А. Москалев)

|                                                                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Предисловие к разделу<br><i>А. А. Москалев</i>                                                                                                                                                                            | 683 |
| Мультиомиксное омоложение: новая стратегия продления жизни<br><i>О. Ю. Рыбина, Е. Г. Пасюкова</i>                                                                                                                         | 684 |
| Метилирование отдельных CpG-сайтов гена <i>CSF1</i> как фактор регуляции его экспрессии и маркер биологического возраста человека<br><i>А. Д. Сергеева, А. Д. Перенков, М. В. Ведунова</i>                                | 694 |
| Белок p62: пересечение путей антиоксидантной защиты и аутофагии<br><i>Г. А. Шиловский</i>                                                                                                                                 | 703 |
| Изучение геропротекторных свойств ингибитора АТМ KU-60019 на особях трех видов <i>Drosophila</i> с разной продолжительностью жизни<br><i>Л. А. Коваль, Н. В. Земская, Н. Р. Пакшина, М. В. Шапошников, А. А. Москалев</i> | 719 |

---

## ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Поиск инсерций мобильных генетических элементов и хромосомных перестроек, влияющих на изменение экспрессии генов, в линиях <i>D. melanogaster</i> с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона <i>gypsy</i><br><i>И. В. Кукушкина, А. Р. Лавренов, П. А. Миляева, А. И. Лавренова, И. В. Кузьмин, Л. Н. Нефедова, А. И. Ким</i> | 743 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

---

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

|                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Пространственная организация хроматина промоторной области гена <i>KLF5</i> в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы<br><i>М. В. Зиновьева, Л. Г. Николаев</i>                                                    | 756 |
| GRIP1 вовлечен во взаимодействие виментиновых филаментов с фокальными контактами в эндотелиальных клетках<br><i>Ф. К. Гюева</i>                                                                                                   | 772 |
| Инактивация фимбрий типа 3 усиливает адгезию <i>Klebsiella oxytoca</i> к клеткам эпителия легких<br><i>А. Г. Гиляева, А. М. Марданова</i>                                                                                         | 784 |
| Структура и функция кластера трансглутаминаз у базального многоклеточного <i>Halisarca dujardinii</i> (губка)<br><i>А. Д. Фиошин, О. И. Кравчук, К. В. Михайлов, Р. Х. Зиганшин, К. И. Адамейко, В. С. Михайлов, Ю. В. Люпина</i> | 797 |

Изменения редокс-статуса и глутатионилирования белков при действии биназы на ВПЧ-16-положительные клетки карциномы SiHa

*А. И. Надырова, И. Ю. Петрушанко, В. А. Митькевич, О. Н. Ильинская*

811

Экспрессия длинных некодирующих РНК и белоккодирующих генов, вовлеченных в окислительный стресс и клеточное старение у больных с хронической обструктивной болезнью легких

*В. А. Маркелов, Г. Ф. Корытина, Ю. Г. Азнабаева, И. А. Гибадуллин, Л. З. Ахмадишина,  
Т. Р. Насибуллин, О. В. Кочетова, А. М. Авзалетдинов, Н. Ш. Загидуллин*

821

---

## **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ**

Точечные мутации V546E и D547N в мотиве RBM-B не влияют на связывание праймазы-полимеразы PrimPol с репликативным белком A и ДНК

*А. А. Манукян, А. В. Макарова, Е. О. Болдинова*

840

## ПРЕДИСЛОВИЕ К РАЗДЕЛУ

Тематический раздел «**Старение и геропротекторные технологии**» посвящен рассмотрению различных аспектов старения организма. Проблема старения и ассоциированных с ним заболеваний является одной из наиболее актуальных в современной биомедицине, что обусловлено глобальными демографическими тенденциями, увеличением продолжительности жизни и доли пожилых людей в структуре населения. Понимание фундаментальных механизмов старения и разработка эффективных геропротекторных технологий становятся ключевыми задачами для улучшения здоровья и качества жизни стареющего населения, а также для снижения социально-экономического бремени, связанного с ассоциированными с возрастом заболеваниями.

Старение — комплексный биологический процесс, в котором задействованы множественные молекулярные и клеточные механизмы. Одним из ключевых факторов старения является генетическая нестабильность, которая включает накопление мутаций, эпигенетические изменения (эпимутации), укорочение теломер, а также реактивацию ретровирусов и ретротранспозонов. Хроническое воспаление низкой интенсивности, известное как инфламмейджинг, также играет значительную роль в процессе старения, приводя к дисфункции тканей и органов. Еще один важный механизм старения — митохондриальная дисфункция, характеризующаяся снижением эффективности производства энергии и увеличением продукции активных форм кислорода. Клеточное старение, при котором клетки перестают делиться и секретируют провоспалительные факторы (SASP), вносит значительный вклад в процесс старения организма. Истощение запасов стволовых клеток, необходимых для регенерации и поддержания гомеостаза тканей, также служит одной из причин возрастных изменений. Кроме того, жесткость и деградация

внеклеточного матрикса приводят к нарушению структуры и функции тканей, нарушению барьерных функций, что способствует развитию ассоциированных с возрастом заболеваний.

Для разработки эффективных геропротекторных технологий и оценки их эффективности необходимы надежные биомаркеры старения и методы определения биологического возраста. Разработка стратегий геропротекторной терапии — одно из наиболее перспективных направлений в области исследований старения. Геропротекторы это вещества, способные замедлять процесс старения и увеличивать продолжительность здоровой жизни. Стратегии генной терапии, направленные на коррекцию возрастассоциированных изменений экспрессии генов и эпигенетических модификаций, также являются перспективным подходом к замедлению старения. Методы клеточной терапии, основанные на использовании стволовых клеток и секретируемых ими факторов, могут способствовать регенерации тканей и восстановлению их функций, что особенно важно в контексте старения.

Данный тематический раздел выпуска посвящен актуальным вопросам изучения механизмов старения и разработки геропротекторных технологий. В статьях раздела рассматриваются последние достижения в области исследований фундаментальных процессов старения. Представленные работы вносят значительный вклад в понимание сложных механизмов старения и открывают новые возможности для разработки эффективных стратегий борьбы с ассоциированными с возрастом заболеваниями и стратегий, направленных на улучшения качества жизни стареющего населения.

© 2024 г. А. А. Москалев

## МУЛЬТИОМИКСНОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ: НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПРОДЛЕНИЯ ЖИЗНИ

© 2024 г. О. Ю. Рыбина<sup>а</sup>, \*, Е. Г. Пасюкова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: flybee@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

В процессе старения происходит накопление нарушений, приводящих к снижению функций тканей и органов, увеличению риска возникновения различных заболеваний и повышению вероятности смерти. Появление возрастных фенотипов тесно связано с накоплением прогрессирующих согласованных изменений эпигенома, транскриптома, протеома, метаболома и микробиома. Зависимые от возраста модификации транскриптома, обусловленные изменением эпигенетической, транскрипционной, посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, приводят к накоплению возрастных изменений протеома и метаболома. В свою очередь, динамические изменения микробиоты в процессе старения также влияют на экспрессию генов и таким образом ведут к возрастным изменениям протеома и метаболома. Недавние исследования показали, что технологии, направленные на мультиомиксное омоложение, приводят к снижению возрастных проявлений и увеличению продолжительности жизни. Так, кратковременная индукция экспрессии факторов транскрипции, обеспечивающих репрограммирование соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки, сопровождается восстановлением паттерна метилирования ДНК и профиля экспрессии транскриптома, характерных для более молодых тканей, что приводит к увеличению продолжительности жизни. В настоящем обзоре мы обсуждаем существующие технологии мультиомиксного омоложения и перспективы их использования для продления жизни и улучшения ее качества.

**Ключевые слова:** старение, продолжительность жизни, мультиомиксные технологии, транскриптом, эпигеном, протеом, метаболом, микробиом

DOI: 10.31857/S0026898424050013, EDN: HUVYAW

### ВВЕДЕНИЕ

Старение характеризуется постепенным ухудшением состояния организма на молекулярном, клеточном и системном уровнях: потерей протеостаза, изменением межклеточных взаимодействий, дисфункцией митохондрий, укорочением теломер и т.д. [1]. Эпигенетические и транскриптомные изменения, ассоциированные со старением, используются для построения “часов старения”, которые с определенной точностью могут предсказать биологический возраст [2, 3]. В то же время известно, что эпигенетические и транскриптомные изменения обратимы, и существует возможность повернуть вспять развитие признаков старения и фенотипически омолодить клетки.

Понятие “омоложение” тесно связано с понятием репрограммирование старения.

Репrogramмирование старения — это один из эффективных подходов к увеличению продолжительности жизни и снижению вредных фенотипических проявлений старения, основанный на использовании эктопической временной экспрессии в клетках факторов транскрипции, применяемых для репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки. Репrogramмирование старения приводит к омоложению эпигенома, а именно, к восстановлению паттерна метилирования ДНК и различных модификаций хроматина, характерных для более молодого возраста. Репrogramмирование старения обращает вспять возрастные изменения не только эпигенома, но и транскриптома, что указывает на существование связи между эпигенетическим и транскриптомным омоложением [4]. Например, в дермальных фибробластах репрограммирование снижает средний возраст

эпигенома и транскриптома примерно на 30 лет, улучшает продукцию коллагенов и медианную скорость миграции клеток [4]. Глобальный мультиомиксный эффект омоложения наблюдается в результате гетерохронного парабиоза [5], при котором хирургически сшитые старые и молодые мыши имеют общий кровоток. В результате такой манипуляции снижается эпигенетический возраст клеток крови и печени, а также омолаживаются их транскриптомы, что приводит к увеличению продолжительности жизни и здоровья мышей [5]. Более того, в ответ на однократную активацию факторов репрограммирования в ряде тканей стареющих мышей наблюдается омоложение на уровне метилирования ДНК, транскрипции, а также метаболома [6]. Омоложение метаболома и транскриптома также происходит при трансплантации микробиоты от молодых мышей старым, что приводит к снижению возрастных нарушений когнитивного поведения [7].

Приведенные примеры свидетельствуют о непосредственной взаимосвязи различных омиксных процессов в ходе индуцированного различными способами омоложения и позволяют предполагать, что такого рода вмешательства, благодаря комплексности воздействия, будут иметь заметное преимущество перед другими подходами, нацеленными на замедление старения и продление жизни.

В этом обзоре мы анализируем данные, касающиеся согласованной мультиомиксной регуляции в процессе старения, а также данные о мультиомиксном омоложении, достигнутом благодаря индукции эктопической экспрессии транскрипционных факторов и применению химических веществ. Мы также обсуждаем перспективы применения этих технологий для создания наиболее эффективной стратегии продления жизни и борьбы с возрастными нарушениями.

### СОГЛАСОВАННАЯ МУЛЬТИОМИКСНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Эпигенетические модификации, в том числе, метилирование ДНК, модификации гистонов, динамически регулируют характер экспрессии генов и участвуют в поддержании идентичности клеток и их функций. Эпигенетические механизмы играют важную роль в адаптивной реакции клеток на сигналы окружающей среды на протяжении всей жизни организма [8]. Однако с возрастом эпигеном претерпевает глубокие изменения (рис. 1).

В процессе старения происходит уменьшение количества гетерохроматина, снижение уровня глобального метилирования ДНК и, в то

же время, усиление сайт-специфического метилирования ДНК, что приводит к изменению транскрипции генов, ведущему к нестабильности генома и активации мобильных элементов [8]. Возрастные изменения характера ацетилирования и метилирования гистонов, влияя на структуру хроматина, также вносят свой вклад в изменение транскрипции генов, приводящее к изменению протеома и метаболома, что способствует формированию возрастного фенотипа [8]. Кроме того, нарушение регуляции некодирующих РНК (нкРНК), включая микроРНК, длинные нкРНК и кольцевые РНК, появляющиеся в процессе старения, приводит к изменению экспрессии генов и клеточного гомеостаза, что еще больше способствует возрастным изменениям [9, 10]. В целом, зависимость от возраста модификация регуляции транскрипции приводит к различным интегральным изменениям на уровне транскриптома, таким как увеличение изменчивости транскриптов из-за накопления ошибок, усиление дисбаланса из-за снижения количества длинных транскриптов, увеличение транскрипции повторяющихся элементов генома и транскрипционного дрейфа [11–16] (рис. 1).

Сравнительный анализ транскриптомов в 17 различных органах и протеомов плазмы крови у мышей 10 различных возрастов показал, что изменения экспрессии генов тесно связаны с изменением количества соответствующих белков в плазме и со старением системного кровообращения [17]. Это является следствием различных возрастных изменений в согласованной возрастной регуляции транскрипционного и трансляционного аппарата, а также посттрансляционной модификации белков, ассоциированной с изменением скорости протеасомной деградации, синтеза, увеличением времени жизни белков и нарушением клеточного протеостаза [18–22] (рис. 1).

Глобальная количественная сравнительная оценка уровня метаболитов и белков у нематод молодого и старого возраста выявила снижение количества белков, участвующих в терминации транскрипции, деградации и поддержании стабильности мРНК, синтезе белка, функциях протеасом и рибосомных белков. Эти возрастные различия сопровождалось изменением метаболизма S-аденозилметионина — важного донора метильных групп, предшественника в синтезе полиаминов, необходимых для регуляции экспрессии генов, а также уменьшением уровня S-аденозилметионинсинтетазы, участвующей в синтезе S-аденозилметионина. Другие изменения, связанные со старением, включали изменения в уровнях и составе свободных жирных кислот; снижение уровней NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы, участвующей в определении окислительно-восстановительного со-

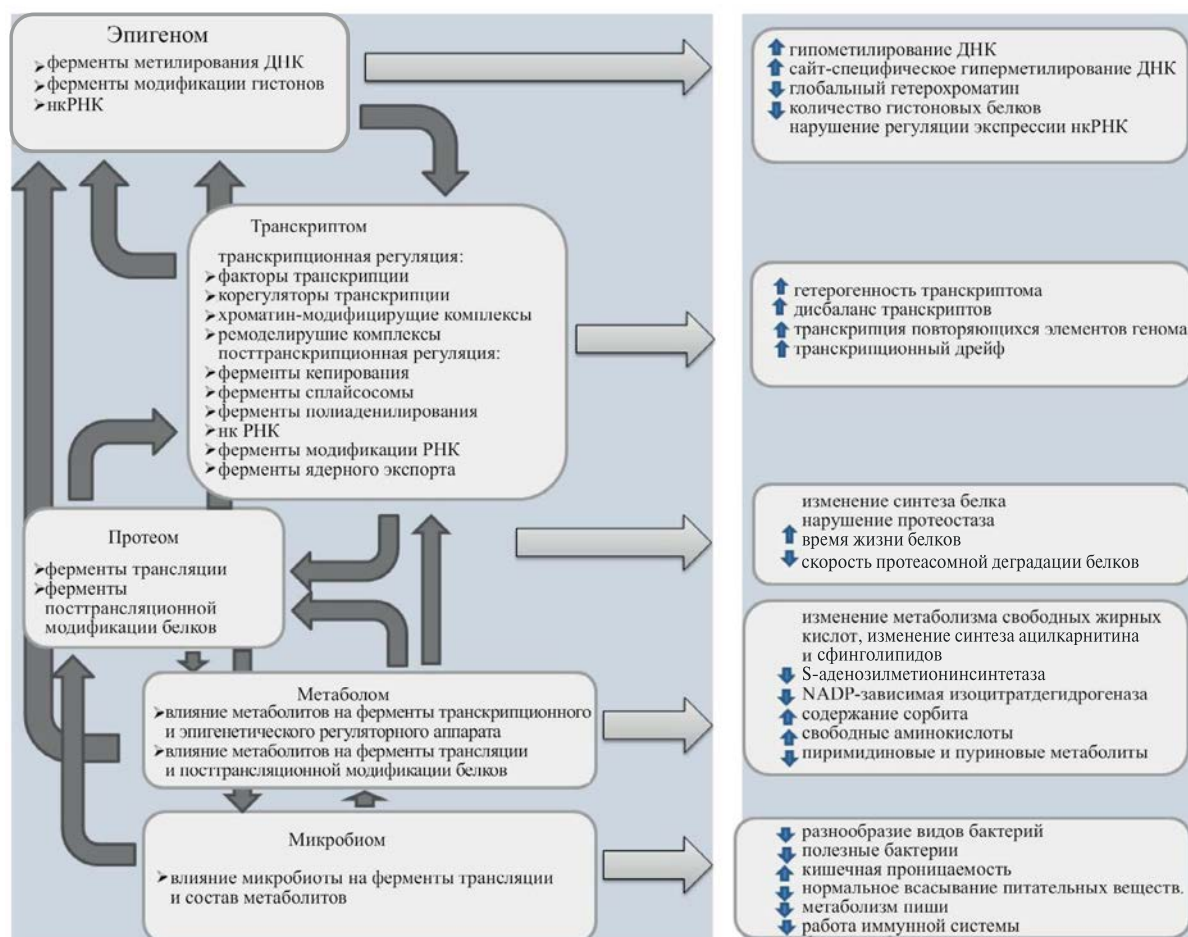


Рис. 1. Согласованная мультиомиксная регуляция в процессе старения.

стояния клеток; увеличение содержания сорбита; увеличение уровней свободных аминокислот и ассоциированное с этим признаком изменение объема клеток; снижение уровней пиримидиновых и пуриновых метаболитов, особенно азотистых оснований [23] (рис. 1). Изучение возрастного метаболизма у человека выявило изменения уровня аминокислот, жирных кислот, метаболизма нуклеотидов, также характерных для нематоды. Обнаружено также изменение синтеза ацилкарнитина и сфинголипидов, которые участвуют в регуляции основных клеточных процессов, таких как апоптоз, пролиферация и старение [24]. Таким образом, полученные данные позволяют сделать обоснованное предположение о значительной роли возрастных изменений метаболома в регуляции экспрессии генов в процессе старения как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции.

Кроме того, немалый вклад в мультиомиксную регуляцию вносит микробиота. Известно, что с возрастом происходит потеря стабильности микробиоты кишечника, что приводит к развитию дисбиотического состояния, характеризующегося уменьшением разнообразия видов

и снижением количества полезных бактерий. В результате повышается кишечная проницаемость, нарушается нормальное всасывание питательных веществ, ухудшается переваривание пищи и снижается работа иммунной системы [25]. Растущее число исследований *in vivo* и *in vitro* демонстрирует, что кишечные микробы и сложные продукты их жизнедеятельности могут регулировать метаболические и иммунные функции хозяина через путь mTOR и приводить к их нарушениям в процессе старения [26, 27] (рис. 1).

Таким образом, приведенные примеры свидетельствуют о согласованной мультиомиксной регуляции, происходящей в ходе старения, что подтверждает сложность и взаимосвязанность различных механизмов, участвующих в этом процессе.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОЕ МУЛЬТИОМИКСНОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ

За последние несколько лет было показано, что эктопическая временная экспрессия факторов транскрипции, они же факторы репрог-

раммирования — Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус и некоторых других — противодействует процессу старения путем комплексного мультиомиксного омоложения [6]. Эффекты факторов репрограммирования изучали преимущественно на культурах различных клеток, полученных от доноров разных видов и разного возраста. Показано [28], что экспрессия факторов Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус, Lin28 и NANOG в эндотелиальных клетках и фибробластах человека, полученных от пожилых доноров, привела к репрограммированию клеточного возраста, причем возраст метилирования снизился примерно на 5 лет в эндотелиальных клетках и на 2 года в фибробластах. В результате экспрессии этих факторов улучшилось физиологическое состояние хондроцитов человека, полученных от пожилых доноров, уменьшились признаки воспаления и повысился их регенеративный потенциал, а в стволовых клетках скелетных мышц, полученных от старых мышей, наблюдалось не только физиологическое улучшение, но и восстановление способности к дифференцировке [28].

Наибольший интерес представляет вопрос о том, как факторы Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус и другие влияют не на клетки, поддерживаемые в культуре, а на живые организмы — на молекулярном уровне и на уровне фенотипов старения. В ряде работ наблюдали эффекты “омоложения” при использовании факторов репрограммирования в отношении нервной системы и возрастного нарушения зрения. Так, согласно [29], временная экспрессия транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 в ганглионарных клетках сетчатки мыши, восстанавливает “молодые” паттерны метилирования ДНК и транскриптома, способствует регенерации аксонов после травмы и обращает вспять потерю зрения у мышей с глаукомой и у старых мышей. Эта работа была дополнена исследованием эпигенетического омоложения в процессе продолжительной (в течение нескольких лет), циклической экспрессии факторов транскрипции Oct4, Sox2 и Klf4 в ганглионарных клетках сетчатки у мышей с глаукомой и старых мышей [30]. За два месяца экспрессии этих факторов репрограммирования нарушенное зрение мышей полностью восстановилось, однако вернулось к исходному в течение 4 недель после прекращения терапии. Очень важно, что у мышей с глаукомой, получавших терапию без перерывов в течение 21 месяца, не наблюдалось никаких побочных эффектов [30]. Примечательно, что недавно зрительная функция была впервые успешно восстановлена с помощью факторов Oct4, Sox2, Klf4 на модели неартериитической передней ишемической оптической нейропатии у нечеловекообразных приматов [31].

В работе по изучению циклической индукции факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус в гиппокампе старых мышей показано снижение триметилирования H3K9, улучшение памяти и увеличение количества мигрирующих клеток, содержащих нейрогенные маркеры в зубчатой извилине гиппокампа, что может способствовать увеличению выживаемости новорожденных нейронов в процессе их созревания и повышению синаптической пластичности зрелых нейронов [32].

Описано влияние так называемых омолаживающих факторов на другие органы и ткани, а также на продолжительность жизни. Показано, что проведенной в раннем возрасте терапии, основанной на однократной индукции факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус, достаточно, чтобы предотвратить ухудшение скелетно-мышечных функций у мышей [33]. Кроме того, у старых мышей, получавших эту терапию, улучшалась структура тканей почек, селезенки, кожи и легких, а продолжительность жизни увеличивалась на 15%, что связано с омоложением органоспецифических дифференциальных возрастных паттернов метилирования ДНК. Показано также, что циклическая индукция транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей на 109%, улучшая при этом некоторые показатели здоровья, включая индекс хрупкости, у мышей старшего возраста [34].

Таким образом, можно ожидать, что генетически индуцированное мультиомиксное омоложение окажется перспективным для развития стратегий продления здоровой жизни. Однако очевидно, что это направление имеет ряд ограничений, связанных с малой изученностью вопроса и со сложностью применения генетического омолаживания у человека. Прежде всего следует отметить, что опубликованные работы касаются влияния на клеточные культуры и модельные организмы временной эктопической экспрессии одного незначительно варьирующего набора генетических факторов. Количество и разнообразие таких работ тоже пока невелико. На целый ряд вопросов пока нет ответов. Неясно, насколько и в каком направлении может быть расширен спектр используемых факторов, каким должен быть оптимальный выбор клеток-мишеней для их применения и соотношение полезных и вредных эффектов использования этих факторов омоложения, какие дополнительные меры необходимо предпринять для защиты клеток от одного из главных недостатков генетического омоложения — возможности потери клетками специализированных функций, необходимых для нормальной работы организма.

## ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОЕ МУЛЬТИОМИКСНОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ

Альтернативный подход к мультиомиксному омоложению связан с использованием различных химических соединений для восстановления эпигенома, транскриптома, протеома, метаболома и микробиома до состояния, характерного для более раннего возраста.

Для химического репрограммирования используют различные малые молекулы, молекулярная масса которых не превышает 1000 г/моль и которые можно условно разделить на три основные категории: сигнальные, эпигенетические и метаболические модификаторы [35]; обычно используют комбинации веществ из разных категорий.

К сигнальным модификаторам относятся вещества, влияющие на работу сигнальных путей, например, рапамицин. Ингибирование с помощью рапамицина серин/треониновой протеинкиназы mTOR, входящей в состав комплексов mTORC1 и mTORC2, приводит к восстановлению транскрипции генов, экспрессия которых изменяется в процессе старения [36], что положительно влияет на синтез белка, аутофагию, а также на энергетический метаболизм [37]. Кроме того, антибиотические свойства рапамицина позволяют контролировать динамику микробиоты в организме, что также вносят вклад в регуляцию метаболома [38]. Такое согласованное мультиомиксное воздействие рапамицина положительно влияет на продолжительность жизни различных модельных организмов [37, 39].

Еще одно вещество, которое можно отнести к модификаторам передачи сигнала, — рифампицин. Рифампицин способен активировать сигнальный путь AMPK, который, в свою очередь, может ингибировать mTOR и, соответственно, влиять на множество процессов, приводящих к изменению экспрессии генома и увеличению продолжительности жизни модельных организмов [37]. Рифампицин это антибиотик, способный ингибировать бактериальную ДНК-зависимую РНК-полимеразу и влиять на динамику микробиоты [37]. Примечательно, что комбинации рапамицина и рифампицина синергически влияют на продолжительность жизни нематоды и дрозофилы [37].

Большинство эпигенетических модификаторов относится к ингибиторам метилтрансфераз или деацетилаз гистонов [35, 40]. Эти вещества способны модифицировать различные эпигенетические метки и тем самым влиять на транскриптом, протеом и, в конечном итоге, играть важную роль в регуляции метаболома. Протестирована способность нескольких комбинаций

различных эпигенетических регуляторов репрограммировать клетки, и на основании этого созданы эффективные коктейли, включающие такие компоненты, как бутират натрия, 5-азациитидин, трихостатин А, DZNep и вальпроевая кислота [35]. Коктейль на основе бутирата натрия, ингибитора гистондеацетилаз, является в настоящее время одним из самых эффективных коктейлей химического репрограммирования, который способен индуцировать статистически значимое снижение транскриптомного возраста как у человека, так и у мышей и положительно влиять на компартиментализацию стареющих клеток [41].

Наконец, метаболические модификаторы характеризуются способностью переключать метаболизм с окислительного фосфорилирования на гликолиз, главным образом, в результате ингибирования серин-треониновой протеинкиназы GSK3. К широко известным ингибиторам GSK3 относятся соединения лития, обязательно входящие в состав каждого коктейля, вызывающего эпигенетическую трансформацию [35], облегчающие и ускоряющие процесс репрограммирования [42].

Таким образом, использование химических веществ позволяет добиться частичного репрограммирования и омолаживания клеток путем восстановления эпигенома, транскриптома и других омиков без изменения их геномной идентичности [41], тем самым предлагая возможно более безопасную альтернативу методам генетических манипуляций. Однако следует иметь в виду, что все вещества, которые использовали для репрограммирования, обладают очень широким спектром действия на организм. Так, например, эпигенетические модификаторы, в соответствии с особенностями механизма своего действия, затрагивают экспрессию большей части генов и, следовательно, комплексно влияют на транскриптом, протеом и метаболом. Точно также нарушение работы сигнальных каскадов и модификация энергетического статуса организма приводят к системным изменениям многих показателей, включая продолжительность жизни. В то же время, генетическая индукция в ряде случаев может, по-видимому, обеспечивать большую избирательность воздействий и эффектов, хотя и в этом случае существенной остается проблема неспецифичности воздействия на состояние организма.

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ МУЛЬТИОМИКСНОГО ОМОЛОЖЕНИЯ

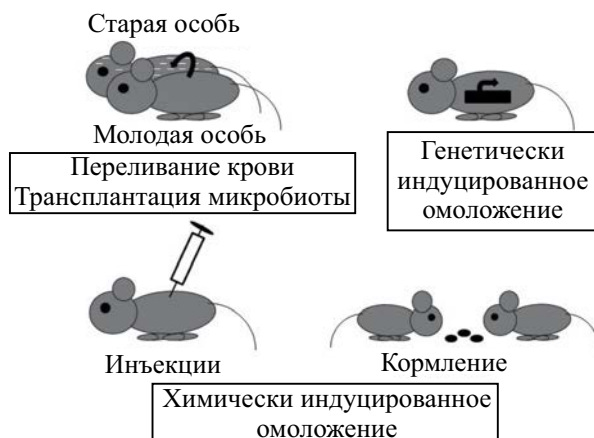
Технологии продления жизни и улучшения ее качества, направленные на мультиомиксное омоложение, в основе которого лежит согла-

сованное восстановление эпигенома, транскриптома, протеома, метаболома и микробиома до уровня, характерного для молодого организма, отличаются большой потенциальной эффективностью. В настоящий момент можно говорить о нескольких принципиально возможных и валидированных в опытах с модельными объектами технологиях мультиомиксного омоложения, таких как генетически и химически индуцированное омоложение и трансплантация (рис. 2). Развитие таких технологий требует проведения поиска оптимальных факторов омоложения и выработки методов их доставки в организм. Кроме того, множество других вопросов, связанных с возможным практическим применением этих подходов, остается пока без ответа. В каком возрасте стоит начинать использование омолаживающих факторов? Какие ткани являются оптимальными мишенями для их воздействия? Какой должна быть интенсивность, продолжительность и периодичность воздействия? Возможности практического использования подобных подходов для омоложения человека пока неочевидны. Тем не менее, хочется верить, что дальнейшая работа, позволит выработать конкретные практические рекомендации, касающиеся технологий мультиомиксного омоложения.

Сам термин мультиомиксное омоложение предполагает, что для его индукции используются факторы, оказывающие комплексное системное воздействие на организм. Действительно, замедление старения и продление жизни связаны с взаимозависимым изменением работы многих тканей и органов, основанной на кардинальной модификации многочисленных молекулярных и клеточных механизмов. В связи с этим именно комплексные воздействия представляются адекватными в том случае, когда необходимо увеличить продолжительность здо-

ровой жизни. Все транскрипционные факторы, эктопическая экспрессия которых индуцировала омоложение, и все вещества, используемые для репрограммирования, обладают очень широким спектром действия на организм, что и делает столь привлекательным их применение для продления жизни. В то же время очевидно, что такое широкое воздействие может иметь нежелательные или даже вредные эффекты [41, 43].

Так, например, эктопическая активация факторов генетического репрограммирования в соматических клетках ведет к формированию профиля экспрессии генов, характерного для эмбриональных стволовых клеток, где эти факторы активны в естественных условиях. Это может приводить к развитию такого нецелевого эффекта, как потеря клеточной идентичности. Но, даже сохраняя свою идентичность благодаря кратковременности активации факторов, соматические клетки приобретают признаки, свойственные эмбриональным стволовым клеткам. В частности, клетки становятся способными к интенсивному делению и регенерации. Насколько полезным окажется такое свойство для клеток разного типа? Возможно, эти качества важны для тканей со сниженной способностью к регенерации, например, для зрительных нервов и мышц, или тканей, чья высокая пролиферативная активность снижается в старости, например кишечного эпителия. В этом контексте очень важным представляется вопрос о выборе эффективных и безопасных клеточных и тканевых мишеней для воздействия омолаживающими факторами. Отметим, что потенциальная возможность выбора мишени считается преимуществом генетических методов. При этом неясно, не приведет ли приобретенная репрограммированными клетками способность к интенсивному делению к увеличению вероятности появления новообразований. Способность генетических факторов индуцировать развитие неопластических изменений в перепрограммированных клетках может оказаться серьезным недостатком для их использования [44]. Кроме того, геномная интеграция, которой способствует использование вирусов в качестве систем доставки омолаживающих факторов, также может спровоцировать развитие опухолей [45]. Все сказанное подчеркивает важность дальнейшего изучения методов и эффектов использования факторов генетического репрограммирования *in vivo*, а также указывает на необходимость поиска новых факторов для определения более безопасных и эффективных способов снижения клеточного возраста. В настоящее время одними из перспективных считаются некоторые ранее охарактеризованные транскрипционные факторы. Например, показано, что циклическая экспрессия укорочен-



**Рис. 2.** Технологии мультиомиксного омоложения.

ной версии FOXM1 задерживает естественное старение у мышей [46]. Показано также, что высококонсервативные комплексы, модифицирующие хроматин, в частности, белки группы Poluscmb, участвующие в контроле продолжительности жизни других модельных организмов [47–49], влияют на процесс эпигенетического репрограммирования клеток [50]. Кроме того, особо перспективным для репрограммирования представляется использование белков семейства спираль-петля-спираль и гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов. Так, например, изменение экспрессии ортолога *Lxh3/4* у дрозофилы влияет на проявление различных маркеров старения и продолжительность жизни [51–53], а временная экспрессия гомеодоменсодержащего транскрипционного фактора *Msx1* восстанавливает в старых миогенных клетках мышей профиль экспрессии генов, характерный для более молодого возраста [54]. Можно ожидать, что использование для индукции омоложения более высокоспециализированных транскрипционных факторов позволит избежать появления нежелательных неспецифических эффектов.

Не менее важным представляется расширение спектра и состава коктейлей химических индукторов репрограммирования и омоложения. Возможность комбинировать вещества для получения наибольшего эффекта в отношении мультиомиксного омоложения и увеличения продолжительности жизни является одним из преимуществ химически индуцированного репрограммирования. Чем больше химических агентов и их комбинаций будет найдено и протестировано, тем больше вероятность найти оптимальные методы омоложения. Среди новых особо перспективных веществ можно назвать радицикол (монорден), обращающий вспять изменения транскриптома и эффективно увеличивающий продолжительность жизни нематоды [55], и фукоксантин, который, влияя на экспрессию генов, приводит к значительному увеличению продолжительности жизни дрозофилы [56].

В настоящее время для индукции мультиомиксного омоложения в качестве триггера используют, главным образом, генетические и химические воздействия на эпигеном, которые приводят к восстановлению эпигенетических меток, характерных для молодого возраста. Направленное изменение микробиома также может инициировать мультиомиксное омоложение. Большой теоретический и практический интерес представляет дальнейшее изучение молекулярных и клеточных основ процессов, которые определяют закономерности трансформаций, происходящих на уровне эпигенома и микробиома, транскриптома, протеома и метаболома,

в последующие изменения. Сложность таких исследований усугубляется неоднозначностью переходов на любом этапе, они включают также петли обратной связи. Вместе с тем, важным представляется поиск агентов, вызывающих омоложение непосредственно протеома и метаболома. Не исключено, что совместное использование агентов различной направленности позволит увеличить эффективность и повысить безопасность потенциальных методов омоложения, в связи с чем изучение взаимной мультиомиксной регуляции необходимо для создания новых подходов к продлению здоровой жизни на основе комбинированной терапии.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. **186**, 243–278.
2. Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14**, R115.
3. Meyer D.H., Schumacher B. (2021) BiT Age: a transcriptome-based aging clock near the theoretical limit of accuracy. *Aging Cell*. **20**, e13320.
4. Gill D., Parry A., Santos F., Okkenhaug H., Todd C.D., Hernando-Herraez I., Stubbs T.M., Milagre I., Reik W. (2022) Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *eLife*. **11**, e71624.
5. Zhang B., Lee D.E., Trapp A., Tyshkovskiy A., Lu A.T., Bareja A., Kerepesi C., McKay L.K., Shindyapina A.V., Dmitriev S.E., Baht G.S., Horvath S., Gladyshev V.N., White J.P. (2023) Multi-omic rejuvenation and life span extension on exposure to youthful circulation. *Nat. Aging*. **3**, 948–964.
6. Chondronasiou D., Gill D., Mosteiro L., Urdinguio R.G., Berenguer-Llargo A., Aguilera M., Durand S., Aprahamian F., Nirmalathasan N., Abad M., Martin-Herranz D.E., Stephan-Otto Attolini C., Prats N., Kroemer G., Fraga M.F., Reik W., Serrano M. (2022) Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell*. **21**, e13578.
7. Boehme M., Guzzetta K.E., Bastiaanssen T.F.S., van de Wouw M., Moloney G.M., Gual-Grau A., Spichak S., Olavarria-Ramirez L., Fitzgerald P., Morillas E., Ritz N.L., Jaggar M., Cowan C.S.M., Crispie F., Donoso F., Halitzki E., Neto M.C., Sichert M., Golubeva A.V., Fitzgerald R.S., Claesson M.J.,

- Cotter P.D., O'Leary O.F., Dinan T.G., Cryan J.F. (2021) Microbiota from young mice counteracts selective age-associated behavioral deficits. *Nat. Aging*. **1**, 666–676.
8. Kane A.E., Sinclair D.A. (2019) Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **54**, 61–83.
9. Kabacik S., Lowe D., Fransen L., Leonard M., Ang S.L., Whiteman C., Corsi S., Cohen H., Felton S., Bali R., Horvath S., Raj K. (2022) The relationship between epigenetic age and the hallmarks of aging in human cells. *Nat. Aging*. **2**, 484–493.
10. Wang K., Liu H., Hu Q., Wang L., Liu J., Zheng Z., Zhang W., Ren J., Zhu F., Liu G.H. (2022) Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **7**, 374.
11. Viñuela A., Brown A.A., Buil A., Tsai P.-C., Davies M.N., Bell J.T., Dermitzakis E.T., Spector T.D., Small K.S. (2018) Age-dependent changes in mean and variance of gene expression across tissues in a twin cohort. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 732–741.
12. Martinez-Jimenez C.P., Eling N., Chen H.C., Vallejos C.A., Kolodziejczyk A.A., Connor F., Stojic L., Rayner T.F., Stubbington M.J.T., Teichmann S.A., de la Roche M., Marioni J.C., Odom D.T. (2017) Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. *Science*. **355**, 1433–1436.
13. Stoeger T., Grant R.A., McQuattie-Pimentel A.C., Anekalla K.R., Liu S.S., Tejedor-Navarro H., Singer B.D., Abdala-Valencia H., Schwake M., Tetreault M.P., Perlman H., Balch W.E., Chandel N.S., Ridge K.M., Sznajder J.I., Morimoto R.I., Misharin A.V., Budinger G.R.S., Nunes Amaral L.A. (2022) Aging is associated with a systemic length-associated transcriptome imbalance. *Nat. Aging*. **2**, 1191–1206.
14. LaRocca T.J., Cavalier A.N., Wahl D. (2020) Repetitive elements as a transcriptomic marker of aging: evidence in multiple datasets and models. *Aging Cell*. **19**, e13167.
15. Li C.-L., Pu M., Wang W., Chaturvedi A., Emerson F.J., Lee S.S. (2021) Region-specific H3K9me3 gain in aged somatic tissues in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **17**, e1009432.
16. Rangaraju S., Solis G.M., Thompson R.C., Gomez-Amaro R.L., Kurian L., Encalada S.E., Niculescu A.B., Salomon D.R., Petrascheck M. (2015) Suppression of transcriptional drift extends *C. elegans* lifespan by postponing the onset of mortality. *Elife*. **4**, e08833.
17. Schaum N., Lehallier B., Hahn O., Pálovics R., Hosseinzadeh S., Lee S.E., Sit R., Lee D.P., Losada P.M., Zardeneta M.E., Fehlmann T., Webber J.T., McGeever A., Calcuttawala K., Zhang H., Berdnik D., Mathur V., Tan W., Zee A., Tan M.; Tabula Muris Consortium; Pisco A.O., Karkanias J., Neff N.F., Keller A., Darmanis S., Quake S.R., Wyss-Coray T. (2020) Aging hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature*. **583**, 596–602.
18. Vernace V.A., Schmidt-Glenewinkel T., Figueiredo-Pereira M.E. (2007) Aging and regulated protein degradation: who has the UPper hand? *Aging Cell*. **6**, 599–606.
19. Kim H.S., Pickering A.M. (2023) Protein translation paradox: implications in translational regulation of aging. *Front. Cell. Dev. Biol.* **11**, 1129281.
20. Miller B.F., Baehr L.M., Musci R.V., Reid J.J., Peelor F.F., Hamilton K.L., Bodine S.C. (2019) Muscle-specific changes in protein synthesis with aging and reloading after disuse atrophy. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. **10**, 1195–1209.
21. Labbadia J., Morimoto R.I. (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 435–464.
22. Anisimova A.S., Alexandrov A.I., Makarova N.E., Gladyshev V.N., Dmitriev S.E. (2018) Protein synthesis and quality control in aging. *Aging* (Albany NY). **10**, 4269–4288.
23. Copes N., Edwards C., Chaput D., Saifee M., Barjuca I., Nelson D., Paraggio A., Saad P., Lipps D., Stevens S.M. Jr., Bradshaw P.C. (2015) Metabolome and proteome changes with aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **72**, 67–84.
24. Johnson L.C., Parker K., Aguirre B.F., Nemkov T.G., D'Alessandro A., Johnson S.A., Seals D.R., Martens C.R. (2019) The plasma metabolome as a predictor of biological aging in humans. *GeroScience*. **41**, 895–906.
25. Donati Zeppa S., Agostini D., Ferrini F., Gervasi M., Barbieri E., Bartolacci A., Piccoli G., Saltarelli R., Sestili P., Stocchi V. (2022) Interventions on gut microbiota for healthy aging. *Cells*. **12**, 34.
26. Gao Y., Tian T. (2023) mTOR signaling pathway and gut microbiota in various disorders: mechanisms and potential drugs in pharmacotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 11811.
27. Huang K., Liu X., Zhang Z., Wang T., Xu H., Li Q., Jia Y., Huang L., Kim P., Zhou X. (2023) AgeAnnoMO: a knowledgebase of multi-omics annotation for animal aging. *Nucl. Acids Res.* **52**, D822–D834.
28. Sarkar T.J., Quarta M., Mukherjee S., Colville A., Paine P., Doan L., Tran C.M., Chu C.R., Horvath S., Qi L.S., Bhutani N., Rando T.A., Sebastiao V. (2020) Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat. Commun.* **11**, 1545.
29. Lu Y., Brommer B., Tian X., Krishnan A., Meer M., Wang C., Vera D.L., Zeng Q., Yu D., Bonkowski M.S., Yang J.H., Zhou S., Hoffmann E.M., Karg M.M., Schultz M.B., Kane A.E., Davidsohn N., Korobkina E., Chwalek K., Rajman L.A., Church G.M., Hochedlinger K., Gladyshev V.N., Horvath S., Levine M.E., Gregory-Ksander M.S., Ksander B.R., He Z., Sinclair D.A. (2020) Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*. **588**, 124–129.
30. Karg M.M., Lu Y.R., Refaian N., Cameron J., Hoffmann E., Hoppe C., Shirahama S., Shah M.,

- Krasniqi D., Krishnan A., Shrestha M., Guo Y., Cermak J.M., Walthier M., Broniowska K., Rosenzweig-Lipson S., Gregory-Ksander M., Sinclair D.A., Ksander B.R. (2023) Sustained vision recovery by *OSK* gene therapy in a mouse model of glaucoma. *Cell Reprogram.* **25**, 288–299.
31. Ksander B., Shah M., Krasniqi D., Gregory-Ksander M., S., Rosenzweig-Lipson S., Broniowska K., Walthier M., Mannick J., Cermak J., Karg M., Shiraahama S., Refaian N., Lu Y., Lawrence M., Rizzo J. F., Sinclair D. (2023) Epigenetic reprogramming – a novel gene therapy that restores vision loss in a nonhuman primate model of NAION. *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.* **64**, 474.
32. Rodríguez-Matellán A., Alcazar N., Hernández F., Serrano M., Ávila J. (2020) *In vivo* reprogramming ameliorates aging features in *dentate gyrus* cells and improves memory in mice. *Stem Cell Repts.* **15**, 1056–1066.
33. Alle Q., Le Borgne E., Bensadoun P., Lemey C., Béchir N., Gabanou M., Estermann F., Bertrand-Gaday C., Pessemesse L., Toupet K., Desprat R., Vialaret J., Hirtz C., Noël D., Jorgensen C., Casas F., Milhavel O., Lemaitre J.M. (2022) A single short reprogramming early in life initiates and propagates an epigenetically related mechanism improving fitness and promoting an increased healthy lifespan. *Aging Cell.* **21**, e13714.
34. Macip C.C., Hasan R., Hoznek V., Kim J., Lu Y.R., Metzger L.E., Sethna S., Davidsohn N. (2024) Gene therapy-mediated partial reprogramming extends lifespan and reverses age-related changes in aged mice. *Cell Reprogram.* **26**, 24–32.
35. Knyazer A., Bunu G., Toren D., Mracica T.B., Segev Y., Wolfson M., Muradian K.K., Tacutu R., Fraifeld V.E. (2021) Small molecules for cell reprogramming: a systems biology analysis. *Aging* (Albany NY). **13**, 25739–25762.
36. Dobson A.J., He X., Blanc E., Bolukbasi E., Feseha Y., Yang M., Piper M.D.W. (2018) Tissue-specific transcriptome profiling of *Drosophila* reveals roles for GATA transcription factors in longevity by dietary restriction. *NPJ Aging Mech. Dis.* **4**, 5.
37. Rybina O.Y., Symonenko A.V., Pasyukova E.G. (2023) Compound combinations targeting longevity: challenges and perspectives. *Ageing Res. Rev.* **85**, 101851.
38. Tucci P., Porta G., Agostini M., Antonov A., Garabadiu A.V., Melino G., Willis A.E. (2013) Rapamycin regulates biochemical metabolites. *Cell Cycle.* **12**, 2454–2467.
39. Nacarelli T., Azar A., Altinok O., Orynbayeva Z., Sell C. (2018) Rapamycin increases oxidative metabolism and enhances metabolic flexibility in human cardiac fibroblasts. *GeroScience.* **40**, 243–256.
40. Pasyukova E.G., Symonenko A.V., Rybina O.Y., Vaiserman A.M. (2021) Epigenetic enzymes: a role in aging and prospects for pharmacological targeting. *Ageing Res. Rev.* **67**, 101312.
41. Yang J.H., Petty C.A., Dixon-McDougall T., Lopez M.V., Tyshkovskiy A., Maybury-Lewis S., Tian X., Ibrahim N., Chen Z., Griffin P.T., Arnold M., Li J., Martinez O.A., Behn A., Rogers-Hammond R., Angeli S., Gladyshev V.N., Sinclair D.A. (2023) Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. *Aging* (Albany NY). **15**, 5966–5989.
42. Wang Q., Xu X., Li J., Liu J., Gu H., Zhang R., Chen J., Kuang Y., Fei J., Jiang C., Wang P., Pei D., Ding S., Xie X. (2011) Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* **21**, 1424–1435.
43. Rilo-Alvarez H., Ledo A.M., Vidal A., Garcia-Fuentes M. (2021) Delivery of transcription factors as modulators of cell differentiation. *Drug. Deliv. Transl. Res.* **11**, 426–444.
44. Taguchi J., Shibata H., Kabata M., Kato M., Fukuda K., Tanaka A., Ohta S., Ukai T., Mitsunaga K., Yamada Y., Nagaoka S.I., Yamazawa S., Ohnishi K., Woltjen K., Ushiku T., Ozawa M., Saitou M., Shinkai Y., Yamamoto T., Yamada Y. (2021) DMRT1-mediated reprogramming drives development of cancer resembling human germ cell tumors with features of totipotency. *Nat. Commun.* **12**, 5041.
45. Wuputra K., Ku C.-C., Wu D.-C., Lin Y.-C., Saito S., Yokoyama K.K. (2020) Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **39**, 100.
46. Ribeiro R., Macedo J.C., Costa M., Ustiyan V., Shindyapina A.V., Tyshkovskiy A., Gomes R.N., Castro J.P., Kalin T.V., Vasques-Nóvoa F., Nascimento D.S., Dmitriev S.E., Gladyshev V.N., Kalinichenko V.V., Logarinho E. (2022) *In vivo* cyclic induction of the FOXM1 transcription factor delays natural and progeroid aging phenotypes and extends healthspan. *Nat. Aging.* **2**, 397–411.
47. Siebold A.P., Banerjee R., Tie F., Kiss D.L., Moskowitz J., Harte P.J. (2010) Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 169–174.
48. Rybina O.Y., Rozovsky Y.M., Veselkina E.R., Pasyukova E.G. (2018) Polycomb/Trithorax group-dependent regulation of the neuronal gene *Lim3* involved in *Drosophila* lifespan control. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **1861**, 451–462.
49. Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Zemskaya N.V., Koval L.A., Schegoleva E.V., Guvatova Z.G., Krasnov G.S., Solovov I.A., Sheptyakov M.A., Zhavoronkov A., Kudryavtseva A.V. (2019) Transcriptome analysis of long-lived *Drosophila melanogaster* E(z) mutants sheds light on the molecular mechanisms of longevity. *Sci. Rep.* **9**, 9151.
50. Singh P.B., Zhakupova A. (2022) Age reprogramming: cell rejuvenation by partial reprogramming. *Development.* **149**, dev200755.
51. Rybina O.Y., Pasyukova E.G. (2010) A naturally occurring polymorphism at *Drosophila melanogaster* *Lim3* locus, a homolog of human LHX3/4, affects

- Lim3* transcription and fly lifespan. *PLoS One*. **5**, e12621.
52. Rybina O.Y., Sarantseva S.V., Veselkina E.R., Bolshakova O.I., Symonenko A.V., Kremontsova A.V., Ryabova E.V., Roshina N.V., Pasyukova E.G. (2017) Tissue-specific transcription of the neuronal gene *Lim3* affects *Drosophila melanogaster* lifespan and locomotion. *Biogerontology*. **18**, 739–757.
  53. Rybina O.Y., Schelkunov M.I., Veselkina E.R., Sarantseva S.V., Kremontsova A.V., Vysokikh M.Y., Melentev P.A., Volodina M.A., Pasyukova E.G. (2019) Knockdown of the neuronal gene *Lim3* at the early stages of development affects mitochondrial function and lifespan in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **181**, 29–41.
  54. Pereira B., Correia F.P., Alves I.A., Costa M., Gam-eiro M., Martins A.P., Saraiva J.A. (2024) Epigenetic reprogramming as a key to reverse ageing and increase longevity. *Ageing Res. Rev.* **95**, 102204.
  55. Janssens G.E., Lin X.-X., Millan-Ariño L., Kavšek A., Sen I., Seinstra R.I., Stroustrup N., Nollen E.A.A., Riedel C.G. (2019) Transcriptomics-based screening identifies pharmacological inhibition of Hsp90 as a means to defer aging. *Cell Rep.* **27**, 467–480.e6.
  56. Moskalev A., Shaposhnikov M., Zemskaya N., Belyi A., Dobrovolskaya E., Patova A., Gumatova Z., Lukyanova E., Snezhkina A., Kudryavtseva A. (2018) Transcriptome analysis reveals mechanisms of geroprotective effects of fucoxanthin in *Drosophila*. *BMC Genomics*. **19**, 77.

## Multi-Omic Rejuvenation: a New Strategy for Lifespan Extension

O. Y. Rybina<sup>1, \*</sup>, E. G. Pasyukova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

\*e-mail: flybee@mail.ru

Various age-related disorders accumulate during aging, causing a decline in tissue and organ function, raising the risk of disease development, and leading to death. Age-related phenotypes are tightly related to an increase in coordinated, progressive changes in the transcriptome, proteome, metabolome, microbiome, and epigenome. Age-dependent modifications of the transcriptome, caused by changes in epigenetic, transcriptional, and post-transcriptional regulation of gene expression, lead to the accumulation of age-related changes in the proteome and metabolome. In turn, dynamic changes in the microbiota during aging also affect gene expression and thus lead to age-related changes in the proteome and metabolome. Recent studies have shown that multi-omics rejuvenation technologies decrease age-related disorders and extend longevity. For example, the short-term induction of the expression of transcription factors that ensure the reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells is accompanied by the restoration of the DNA methylation pattern and transcriptome expression profile characteristic of younger tissues, resulting in an increased lifespan. In this review, we discuss existing multi-omics rejuvenation technologies and the prospects for extending and improving life.

**Keywords:** aging, lifespan, multi-omics technologies, transcriptome, epigenome, proteome, metabolome, microbiome

УДК 577.24

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ CpG-САЙТОВ ГЕНА *CSF1* КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ И МАРКЕР БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. Д. Сергеева<sup>а</sup>, \*, А. Д. Перенков<sup>а</sup>, М. В. Ведунова<sup>а</sup><sup>а</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

Нижний Новгород, 603022 Россия

\*e-mail: a.d.sergeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Ассоциированное с возрастом изменение характера метилирования считается важным предиктором биологического возраста человека. Изменение уровня метилирования CpG-динуклеотидов способствует сдвигу в работе ряда генов, в том числе ассоциированных с функционированием иммунной системы. В число этих генов входит ген *CSF1*, белковый продукт которого ассоциирован с воспалительным старением, что делает его важным биомаркером возрастзависимых заболеваний. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии определен профиль метилирования ассоциированного с промотором CpG-островка гена *CSF1*. Проведен поиск зависимостей между характером метилирования CpG-сайтов внутри исследуемых регионов и относительным уровнем мРНК гена *CSF1* и его белковым продуктом у лиц разных возрастных групп. Показан высокий уровень корреляции двух CpG-сайтов с исследуемыми параметрами и установлено, что эти CpG-динуклеотиды входят в состав сайтов связывания факторов транскрипции семейства NFI и фактора EGR1. Предполагается, что эти CpG-сайты играют важную роль в регуляции экспрессии гена *CSF1*.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, возрастные изменения, CpG-островки, ген *CSF1***DOI:** 10.31857/S00268998424050024, **EDN:** HUUTDV

### ВВЕДЕНИЕ

Старение — биологический процесс, характеризующийся возрастным снижением функций, которое захватывает все уровни организации организма [1]. При старении изменяется экспрессия генов, часть из которых, например генов, связанных с репарацией ДНК, активируется, а генов, ответственных за трансляцию, и генов, кодирующих белки цепи переноса электронов, напротив, подавляется [2]. Сдвиги в экспрессии генов связаны не только с накопленными в течение жизни мутациями, но и с генетической программой онтогенеза [3].

Важную роль в регуляции активности генов играют эпигенетические изменения. Метилирование ДНК считается наиболее точным из всех эпигенетических меток предиктором биологического возраста [4]. Известно, что с возрастом происходит глобальное гипометилирование генома с локальным гиперметилированием промоторных областей некоторых генов [5]. К генам, степень метилирования которых изме-

няется с возрастом, относятся гены, связанные с функционированием иммунной системы [6].

Важную роль в регуляции транскрипции генов играют промоторы, расположенные выше точки начала транскрипции [7, 8], подверженной различным модификациям. Метилирование промоторного региона, как правило, ингибирует экспрессию гена [9]. Считается, что степень модификации промоторной области гена негативно коррелирует с уровнем его транскрипции [10]. Гены, содержащие CpG-островки в промоторной области, характеризуются, как правило, относительно стабильным уровнем экспрессии во многих типах клеток. К таким генам относятся так называемые гены домашнего хозяйства и гены, связанные с регуляцией развития [11]. Еще одним участком, который может быть ассоциирован с транскрипционной активностью гена, считается первый интрон. Снижение уровня метилирования CpG-динуклеотидов внутри этого участка способно активировать внутренние сайты транскрипции,

приводя к образованию альтернативных вариантов мРНК [12–14].

Процесс старения характеризуется повышением синтеза провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины (IL)-6 и -12, фактор некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и др. [15]. Наиболее заметно с возрастом ассоциированы макрофагальный колониестимулирующий фактор-1 (CSF1), CXCL1, CXCL9, IL-6, фактор роста сосудистого эндотелия A (VEGFA) [16, 17]. Согласно существующим представлениям CSF, или M-CSF1 ассоциирован с возрастзависимыми патологиями, такими как болезнь Альцгеймера, сердечно-сосудистые заболевания, катаракта и хронические болезни почек [17, 18]. Повышение экспрессии гена *CSF1* в опухолях, в частности в таких, как рак молочной железы, предстательной железы и яичников, усиливает онкогенность опухоли, способствует ее ускоренному метастазированию и инвазивности [19]. Показано также, что возрастзависимое повышение содержания CSF1 в крови замедляет заживление ран у мышей [20].

В норме M-CSF отвечает за дифференцировку, пролиферацию и выживаемость макрофагов и их предшественников, участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки остеокластов, а также в резорбции костной ткани. M-CSF участвует в стимуляции высвобождения провоспалительных цитокинов при воспалительных процессах. Основными клетками, способными к синтезу M-CSF, являются остеобласты и остециты. Альтернативный сплайсинг мРНК гена *M-CSF* приводит к образованию трех вариантов биологически активных молекул: мембраносвязанного гликопротеина, секретируемого гликопротеина и секретируемого протеогликана [21, 22].

В представленной работе определен уровень метилирования двух регуляторных участков гена *CSF1*, относительный уровень мРНК и количество белка CSF1 в периферической крови доноров разного возраста.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Из биобанка, содержащего 486 образцов периферической крови условно здоровых доноров, произвольным образом выбраны 26 (19 от доноров женского пола, 7 — мужского). Возраст доноров составил 48.1 (23.0; 58.3) лет. Согласно возрастной классификации Всемирной организации здравоохранения, исследуемая выборка была разделена на три группы: до 45 лет (13 человек), 45–59 лет (семь человек), 60–85 лет (шесть человек).

Геномную ДНК выделяли с помощью набора ДНК-Экстран-1 (“Синтол”, Россия)

по инструкции производителя. Концентрацию нуклеиновой кислоты определяли на флуориметре Qubit 4 с использованием набора Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (“ThermoFisher”, США). Геномную ДНК (1 мкг) подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора BisQuick (“Евроген”, Россия). Образец, полученный после конверсии, использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Праймеры для оценки метилирования подбирали с использованием сервиса EpiDesigner (“Agena Bioscience”, США).

Праймеры к промотору:

*prom\_f*: aggaagagagGTTAGTATTGAATTAGT TTGGAGAG;

*prom\_r*: cagtaatacgactcactatagggagaaggctAAAAA ACCCAAACAACCTTTCACTT.

К интрону:

*int\_f*: aggaagagagGGGATTGTTAG-GTTTTTTTGGG;

*int\_r*: cagtaatacgactcactatagggagaaggctAATTA-ACCCCTAAACCTTTCCCTAC.

К обратным праймерам добавлены последовательности промотора T7-полимеразы для последующих этапов синтеза РНК.

Исследуемый GC-богатый фрагмент гена *CSF1* амплифицировали с использованием 2 × Tersus буфера (“Евроген”), 1 U SynTaq ДНК-полимеразы (“Синтол”). Амплификацию проводили по следующей программе: предварительная денатурация — 5 мин при 95°C; 45 циклов: 95°C — 30 с, 56°C — 30 с, 72°C — 1 мин, затем финальная элонгация при 72°C в течение 7 мин.

После ПЦР неприсоединенные dNTP дефосфорилировали при помощи щелочной фосфатазы креветки (SAP, “Agena Bioscience”, США). На следующем этапе проводили специфическую реакцию MassCLEAVE, в ходе которой происходят две совмещенные реакции: *in vitro* транскрипция РНК с последующим урацилспецифичным гидролизом. Результаты оценивали на MALDI-TOF масс-спектрометре MassARRAY (“Agena Bioscience”) с использованием программного обеспечения EpiTYPER.

Относительный уровень мРНК CSF1 оценивали методом ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использовали ген *TBP*, кодирующий ТАТА-связывающий белок. мРНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран (“Синтол”) по инструкции производителя. После этого проводили обратную транскрипцию, используя набор ОТ-1 (“Синтол”) и специфические обратные праймеры. ПЦР

в реальном времени проводили со следующими праймерами:

CSF\_fw 5'-gggctccctgctgtt-3'

CSF\_rv 5'-gcacactggatcttcaact-3';

TBP\_fw 5'-cgaatataatccaagcggtt-3'

TBP\_rv 5'-ctggactgttcttcactctt-3'.

Амплификацию проводили на амплификаторе CFX96 Touch ("Bio-Rad", США) по следующей программе: предварительная денатурация — 5 мин при 95°C; затем 45 циклов — 30 с при 95°C, 20 с при 58°C и 30 с при 72°C, с последующим считыванием интенсивности флуоресценции. ПЦР проводили с использованием готовой 2.5 × смеси SYBR Green I ("Синтол"). Данные обрабатывали методом  $\Delta\Delta C_t$ . Данные нормировали с использованием гена *TBP* в качестве референсного.

Количество CSF1 в плазме крови определяли по технологии xMAP ("LUMINEX", США) с использованием коммерческого набора Milliplex MAP ("Millipore", США) в соответствии с инструкцией производителя. Панель включала оценку 47 цитокинов, включая CSF1. Плазму крови с иммобилизованными антителами инкубировали при перемешивании в течение ночи (16–18 ч) при 2–8°C. Для регистрации и анализа данных использовали стандартный набор программ на приборе Luminex MAGPIX

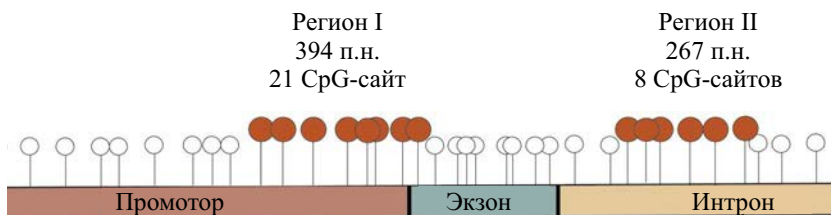
("LUMINEX"). Коэффициент детерминации каждого анализа был не ниже 0.95.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 10. Для оценки корреляции использовали коэффициент Спирмена. Сравнение групп проводили с использованием критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Поиск мест посадки транскрипционных факторов проводили с использованием GenomeBrowser.

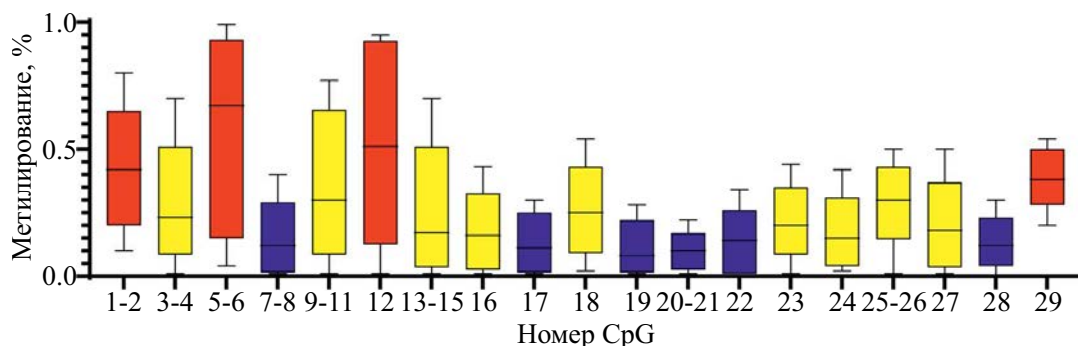
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ген *CSF1* картирован в области chr1:110,453,233–110,473,616 (GRCh37/hg19). На первом этапе исследования для анализа метилирования были выбраны два фрагмента CpG-островков в регуляторной области гена, локализованные в промоторе (chr1: 110453116–110453510) и в первом интроне (chr1: 110453889–110454155) гена *CSF1*. Схема целевых регионов представлена на рис. 1.

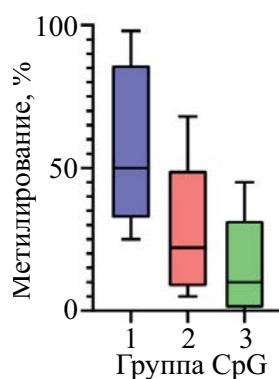
Всего проанализированы 29 CpG-сайтов (последовательно названных CpG1–29), некоторые CpG-динуклеотиды, расположенные в этих регионах, не были эпителированы из-за ограничения технологии MassARRAY. Определены средние уровни метилирования CpG-сайтов в обоих регионах (рис. 2). Уровень метилирования составил 42% (26%; 50%).



**Рис. 1.** Схема участков гена *CSF1*, выбранных для анализа метилирования. Регион I находится в промоторе и частично в первом экзоне гена *CSF1*, он содержит 21 анализируемый CpG-динуклеотид. Регион II расположен в первом интроне гена и содержит восемь анализируемых CpG-сайтов.



**Рис. 2.** Диаграмма разброса уровня метилирования CpG-сайтов в исследуемых регионах гена *CSF1*. Красным обозначены CpG-сайты с высоким уровнем метилирования; желтым — со средним; синим — с низким.



**Рис. 3.** CpG-сайты гена *CSF1* с разным уровнем метилирования. 1 – Группа с высоким уровнем метилирования; 2 – группа со средним уровнем метилирования; 3 – группа с низким уровнем метилирования.

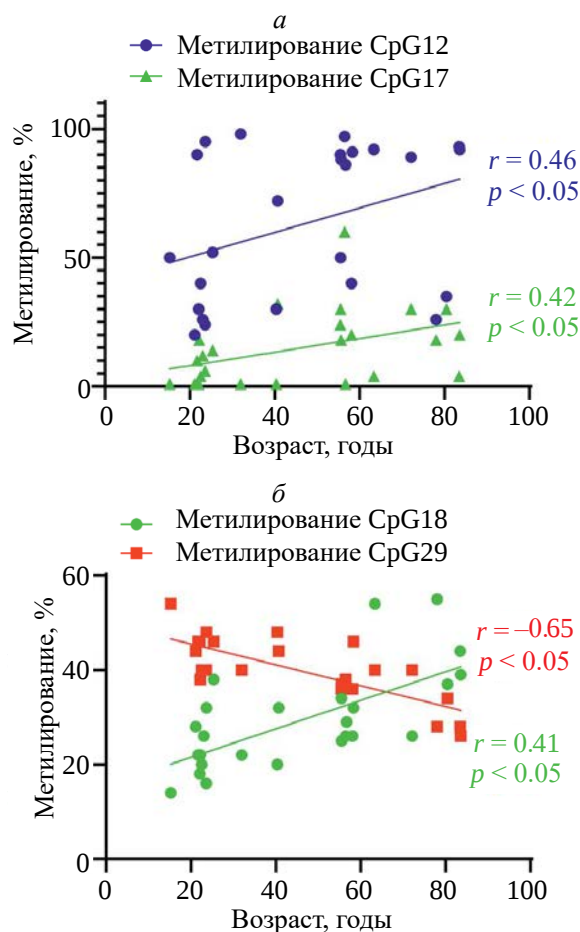
Уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в регионе I, составил 20% (8%; 40%), причем ближе к точке начала транскрипции уровень метилирования был ниже. В регионе II уровень метилирования CpG-сайтов составил 18% (8%; 40%). Внутри регионов все CpG-сайты были разделены на три группы, достоверно различающиеся ( $p < 0.05$ ) по уровню метилирования. Для CpG-динуклеотидов с высоким уровнем метилирования медиана составила 50% (40%; 74%), со средним уровнем – 22% (12%; 30%), с низким – 10% (2%; 18%) (рис. 3).

Установлено влияние возраста на метилирование CpG-сайтов региона II в группах CpG с высоким ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и низким ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.05$ ) уровнями метилирования в группе 45–59 лет. Обнаружена положительная корреляция уровней метилирования CpG12 ( $r = 0.46$ ,  $p < 0.05$ ), CpG17 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.05$ ), CpG18 ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.65$ ,  $p < 0.05$ ) с возрастом доноров (рис. 4).

Затем в соответствии с новой классификацией ВОЗ сформировали возрастные группы доноров. Выявили корреляции между уровнями метилирования CpG-сайтов и возрастом. В группе 15–44 года установлена корреляция уровней метилирования сайтов CpG7, CpG8 ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ), CpG12 ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ) с возрастом.

В группе 45–59 лет выявлена зависимость уровня метилирования сайтов CpG22 ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ) от возраста доноров. В группе 60–85 лет установлена корреляция между уровнем метилирования CpG29 ( $r = -0.84$ ,  $p < 0.05$ ) и возрастом.

Обнаружено, что уровни метилирования CpG18 ( $H = 6.35$ ,  $p < 0.05$ ), CpG19 ( $H = 6.04$ ,



**Рис. 4.** Уровень метилирования CpG12 и CpG17 (а), CpG18 и CpG29 (б) у доноров разных возрастных групп.

$p < 0.05$ ) и CpG29 ( $H = 12.16$ ,  $p < 0.05$ ) различались в зависимости от возраста доноров (рис. 5).

Относительный уровень мРНК гена *CSF1* составил 0.85 (0.37; 1.38). Не найдено корреляции между уровнем мРНК и возрастом доноров как во всей выборке, так и в выделенных возрастных группах.

Установлены корреляции между метилированием некоторых CpG-сайтов и относительным уровнем мРНК *CSF1*. В группе доноров 45–59 лет выявлено влияние метилирования CpG22 ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG24 ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.05$ ) на относительный уровень мРНК *CSF1*. В группе 60–85 лет такая зависимость обнаружена для CpG18 ( $r = -0.9$ ,  $p < 0.05$ ) и CpG29 ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 6).

Проведенный на следующем этапе анализ выявил положительную зависимость между количеством М-СФС (*CSF1*) в плазме и возрастом доноров ( $r = 0.63$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 7).

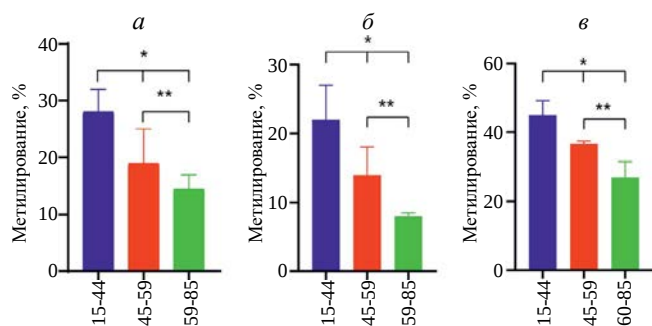


Рис. 5. Уровни метилирования CpG18 (а), CpG19 (б) и CpG29 (в) в разных возрастных группах.

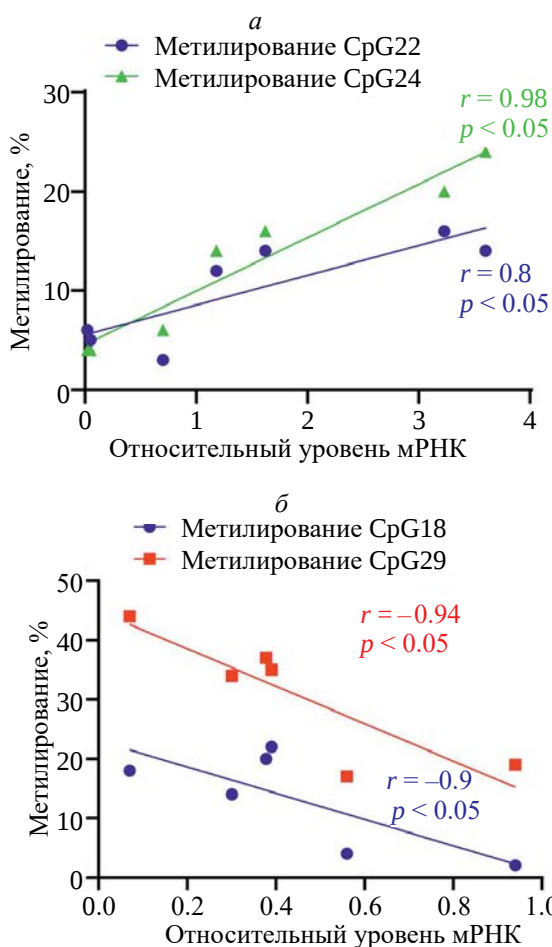


Рис. 6. Зависимость уровня метилирования CpG22 и CpG24 (а), CpG18 и CpG29 (б) от относительного уровня мРНК CSF1 у доноров.

Нами не обнаружено зависимости между уровнем мРНК CSF1 и количеством белка как во всей выборке, так и внутри разных возрастных групп. В регионе I показана корреляция между уровнем белка и степенью метилирования группы CpG с низким уровнем метилирования ( $r = -0.82$ ,  $p < 0.05$ ). В регионе II обнаружена зависимость между уровнем метилирования

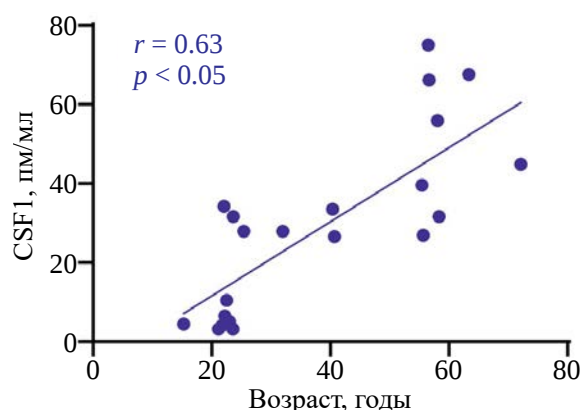


Рис. 7. Уровень CSF1 в плазме доноров разного возраста.

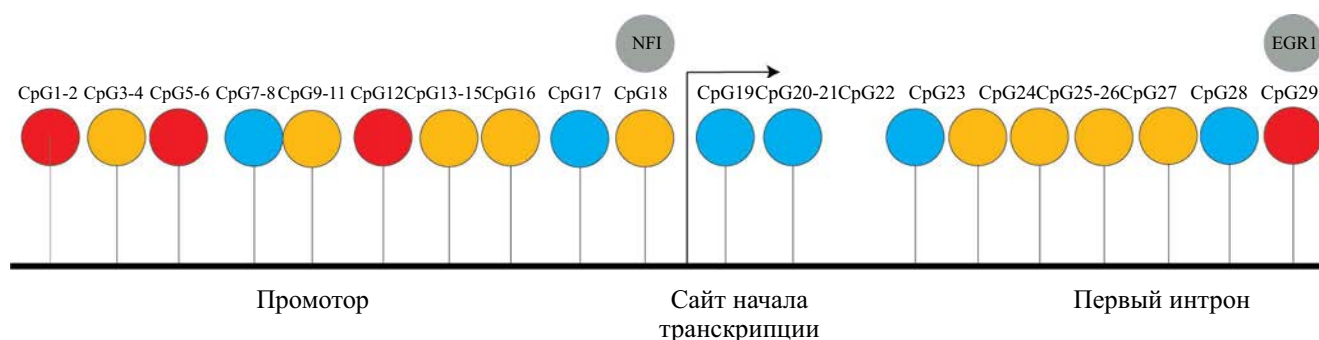
CpG в группе с высоким уровнем и количеством белка M-CSF в плазме ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ).

Также внутри возрастных групп установлены корреляции между метилированием отдельных CpG-сайтов и количеством белка M-CSF в плазме. В группе 15–44 лет выявлена зависимость как метилирования CpG27 ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.05$ ), так и медианного уровня метилирования региона II ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.05$ ) от уровня белка. В группе 45–59 лет обнаружена корреляция между метилированием CpG7, CpG8 ( $r = -0.82$ ,  $p < 0.05$ ), медианным уровнем метилирования региона I ( $r = -0.85$ ,  $p < 0.05$ ) и уровнем CSF1 в плазме. В группе 60–85 лет установлена зависимость между уровнем метилирования CpG29 ( $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$ ) и количеством CSF1.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе проведен поиск CpG-сайтов – маркеров активации гена *CSF1*, имеющего принципиальное значение для идентификации возрастзависимых изменений в организме человека и развития ряда патологий.

Изучена взаимосвязь между уровнями метилирования двух регионов, расположенных внутри CpG-островка гена *CSF1*, относительным уровнем мРНК данного гена, количеством белка в плазме и возрастом доноров. Целевая область региона I включает 21 CpG-сайт, доступный для эпителирования, регион II содержит восемь таких сайтов. Общий профиль метилирования обоих регионов в выборке характеризуется средней степенью метилирования (рис. 8). Ближе к точке начала транскрипции уровень метилирования региона I заметно ниже, что, по-видимому, может быть связано с необходимостью посадки транскрипционных факторов. В регионе II такой зависимости не наблюдается. Регион II локализован внутри интрона, по-



**Рис. 8.** Схема исследуемого региона CpG-островка гена *CSF1*. Красным цветом обозначены CpG с высоким уровнем метилирования, желтым — со средним, синим — с низким. Стрелка показывает направление транскрипции. Серыми кругами указаны транскрипционные факторы, в сайты посадки которых входят указанные CpG-динуклеотиды. CpG1–21 относятся к промотору, CpG22–29 — к интрону. Транскрипционные факторы семейства NFI и фактор EGR1 ассоциированы с регуляцией гена *CSF1*.

этому относительно невысокий уровень его метилирования может указывать на его использование в качестве альтернативного сайта начала транскрипции, или, напротив, приводить к раннему прерыванию транскрипции. Еще одной возможной функцией этого региона может быть помощь *цис*-регуляторным элементам в регуляции транскрипции [23]. В интроне 1 гена *CSF1* расположен энхансер, который, предположительно, может быть усилен внутренним CGI.

В профиле метилирования исследуемых регионов CpG-островка гена *CSF1* выделены три группы CpG-сайтов с разным уровнем метилирования. Отсутствие различий в общем уровне метилирования этих групп между возрастными группами доноров может говорить о том, что, возможно, метилирование отдельных CpG-сайтов играет более важную роль в регуляции *CSF1*. Обнаружено изменение уровня модификации некоторых CpG-сайтов в зависимости от возраста доноров. Однако метилирование большей части CpG-сайтов не изменялось с возрастом. Возможно, что модификация конкретных сайтов в данном случае более важна для транскрипции, чем профиль метилирования в целом. Так, например, согласно данным S. Ogushi и соавт., уровень метилирования CpG-сайтов, локализующихся рядом с сайтами посадки транскрипционных факторов, влияет на активность гена металлопротеиназа-1 [24].

Деление выборки на возрастные группы позволило обнаружить некоторые зависимости между уровнями метилирования и другими параметрами. Наиболее заметные изменения наблюдали в группе 45–59 лет. Возможно, в этот период происходят активные изменения гомеостатического профиля, которые приведут в дальнейшем к состоянию, называемому воспалительным старением [25].

Отсутствие корреляции между относительным уровнем мРНК и степенью метилирования, а также уровнем белка в плазме может говорить о более существенном влиянии на транскрипцию гена *CSF1* других эпигенетических факторов, например, микроРНК, кольцевых РНК, длинных некодирующих РНК или модификации гистонов [26–29].

Наиболее выражена корреляция уровней метилирования CpG18 и CpG29 с другими показателями. В старшей возрастной группе показана зависимость между метилированием этих сайтов и уровнем мРНК. Выявлена также зависимость между степенью метилирования сайта CpG29 и белковым продуктом гена *CSF1* у лиц 60–85 лет. Методом поиска сайтов посадки установлено, что CpG18 входит в сайт связывания факторов семейства NFI, а CpG29 ассоциирован с транскрипционным фактором EGR1.

Транскрипционные факторы NFI необходимы для привлечения BAF-комплекса к промотору с его последующей активацией [30]. Установлено, что члены семейства NFI активно экспрессируются в разных видах опухолей, а также при возрастных изменениях [31]. L.M. Reynolds и соавт. показали, что экспрессия NFIA в моноцитах зависит от ассоциированной с возрастом степени метилирования ряда CpG-сайтов [32].

EGR1 участвует в регуляции факторов роста, генов репарации ДНК, а также при повреждениях тканей и фиброзе [33]. Показано, что фосфорилирование EGR1 приводит к блокированию транскрипции SP1-зависимых генов [34]. Известна связь воспаления с EGR1. Данный транскрипционный фактор способен подавлять активацию макрофагов путем блокировки активности усилителей воспаления [35]. Сайты связывания EGR1 локализованы как в промоторах (41.6% всех сайтов), так и в интронах (26.4%). Часто (31%) сайт связы-

вания данного фактора находится в пределах CpG-островков [36].

В гене *CSF1*, сайт связывания EGR1 находится в пределах первого интрона и входит в состав CpG-островка

Показано, что экспрессия факторов EGR1 и NF1 увеличивается с возрастом [37]. Это позволяет предположить, что эти белки играют важную роль в регуляции транскрипции гена *CSF1*. CpG-18 и CpG-29, локализованные в гене *CSF1*, ассоциированы с данными транскрипционными факторами. Возрастная зависимость уровня метилирования CpG-сайтов, входящих в состав сайтов связывания EGR1 и NF1, может изменять активность транскрипции гена. Таким образом, высокоточным методом MALDI-TOF показана потенциальная возможность использования уровня метилирования CpG18 и CpG29 в промоторной и интронной областях гена *CSF1* в качестве маркера возрастзависимых изменений.

Авторы благодарят Кондакову Е.В. за помощь в проведении экспериментов по оценке уровня белка M-CSF.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSWR-2023\_0032).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследования проведены в соответствии с правилами локального этического комитета Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (протокол № 1 от 02.12.2020). Все испытуемые получили описание исследования и дали письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang S., Guo Y. (2020) Epigenetic clock: DNA methylation in aging. *Stem Cells Int.* **2020**, 1047896.
- Perez-Gomez A., Buxbaum J.N., Petrascheck M. (2020) The aging transcriptome: read between the lines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **63**, 170–175.
- Takasugi M., Yoshida, Y., Nonaka Y., Ohtani N. (2023) Gene expressions associated with longer lifespan and aging exhibit similarity in mammals. *Nucl. Acids Res.* **51**(14), 7205–7219.
- Chen L., Ganz P.A., Sehl M.E. (2022) DNA methylation, aging, and cancer risk: a mini-review. *Front. Bioinform.* **2**, 847629.
- Johnson A.A., Akman K., Calimport S.R., Wuttke D., Stolzing A., de Magalhães J.P. (2012) The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* **15**(5), 483–494.
- Keenan C.R., Allan R.S. (2019) Epigenomic drivers of immune dysfunction in aging. *Aging Cell.* **18**(1), e12878.
- Einarsson H., Salvatore M., Vaagensø C., Alcaraz N., Bornholdt J., Rennie S., Andersson R. (2022) Promoter sequence and architecture determine expression variability and confer robustness to genetic variants. *eLife.* **11**, e80943.
- Kreamer N.N., Phillips R., Newman D.K., Boedicker J.Q. (2015) Predicting the impact of promoter variability on regulatory outputs. *Sci. Rep.* **5**, 18238.
- Nojima S., Fuchikamia M., Kataokaa T., Arakia M., Omuraa J., Miyagia T., Okamotoa Y., Hishimotoa A., Morinobu S. (2021) Alterations in DNA methylation rates of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia. *Eur. J. Psychiatry.* **35**(2), 67–74.
- de Mendoza A., Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biol.* **23**(1), 163.
- Vavouri T., Lehner B. (2012) Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.* **13**(11), R110.
- Nam A.R., Lee K.H., Hwang H.J., Schabert J.J., An J.H., Won S.H., Cho J.Y. (2020) Alternative methylation of intron motifs is associated with cancer-related gene expression in both canine mammary tumor and human breast cancer. *Clin. Epigenetics.* **12**(1), 110.
- Zhang X., Wu M., Xiao H., Lee M.T., Levin L., Leung Y. K., Ho S.M. (2010) Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the *PMP24* gene in prostate cancer. *Prostate.* **70**(7), 765–776.
- Hong J., Je-Keun R. (2022) Genomic effect of DNA methylation on gene expression in colorectal cancer. *Biology.* **11**(10), 1388.
- Walker K.A., Basisty N., Wilson D.M., 3rd, Ferrucci L. (2022) Connecting aging biology and inflammation in the omics era. *J. Clin. Invest.* **132**(14), e158448.
- Li X., Li C., Zhang W., Wang Y., Qian P., Huang H. (2023) Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**(1), 239.
- Yusipov I., Kondakova E., Kalyakulina A., Kriwonosov M., Lobanova N., Bacalini M.G., Franceschi C., Vedunova M., Ivanchenko M. (2022) Accelerated epigenetic aging and inflammatory/

- immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease. *GeroSci.* **44**(2), 817–834.
18. Wing M.R., Devaney J.M., Joffe M.M., Xie D., Feldman H.I., Dominic E.A., Guzman N.J., Ramirezani A., Susztak K., Herman J.G., Cope L., Harmon B., Kwabi-Addo B., Gordish-Dressman H., Go A.S., He J., Lash J.P., Kusek J.W., Raj D.S., Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study (2014) DNA methylation profile associated with rapid decline in kidney function: findings from the CRIC study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**(4), 864–872.
  19. Maldonado M.D.M., Schlom J., Hamilton D.H. (2023) Blockade of tumor-derived colony-stimulating factor 1 (CSF1) promotes an immune-permissive tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* **72**(10), 3349–3362.
  20. Ambrosi T.H., Marecic O., McArdle A., Sinha R., Gulati G.S., Tong X., Wang Y., Steininger H.M., Hoover M.Y., Koepke L.S., Murphy M.P., Sokol J., Seo E.Y., Tevlin R., Lopez M., Brewer R.E., Mascharak S., Lu L., Ajanaku O., Conley S.D., Seita J., Morri M., Neff N.F., Sahoo D., Yang F., Weissman I.L., Longaker M.T., Chan C.K.F. (2021) Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature.* **597**(7875), 256–262. doi: 10.1038/s41586-021-03795-7
  21. Plotkin L.I., Bivi N. (2014) Chapter 3: Local regulation of bone cell function. In: *Basic and Applied Bone Biology*. Eds Burr D.B., Allen M.R. San Diego: Acad. Press, pp. 47–73.
  22. Menke J., Iwata Y., Rabacal W.A., Basu R., Stanley E.R., Kelley V.R. (2011) Distinct roles of CSF-1 isoforms in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**(10), 1821–1833.
  23. Cain J.A., Montibus B., Oakey R.J. (2022) Intragenic CpG Islands and their impact on gene regulation. *Front. Cell Develop. Biol.* **10**, 832348.
  24. Ogushi S., Yoshida Y., Nakanishi T., Kimura T. (2020) CpG site-specific regulation of metallothionein-1 gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(17), 5946.
  25. Piber D., Olmstead R., Cho J.H., Witarama T., Perez C., Dietz N., Seeman T.E., Breen E.C., Cole S.W., Irwin M.R. (2019) Inflammaging: age and systemic, cellular, and nuclear inflammatory biology in older adults. *J. Gerontol. Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci.* **74**(11), 1716–1724.
  26. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402.
  27. Zhou, W.Y., Cai Z.R., Liu J., Wang D.S., Ju H. Q., Xu R.H. (2020) Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Mol. Cancer.* **19**(1), 172.
  28. Dong X., Weng Z. (2013) The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics.* **5**(2), 113–116.
  29. Kaikkonen M.U., Lam M.T., Glass C.K. (2011) Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Res.* **90**(3), 430–440.
  30. Liu R., Liu H., Chen X., Kirby M., Brown P.O., Zhao K. (2001) Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell.* **106**(3), 309–318.
  31. Fane M., Harris L., Smith A.G., Piper M. (2017) Nuclear factor one transcription factors as epigenetic regulators in cancer. *Int. J. Cancer.* **140**(12), 2634–2641.
  32. Reynolds L.M., Taylor J.R., Ding J., Lohman K., Johnson C., Siscovick D., Burke G., Post W., Shea S., Jacobs D.R., Jr, Stunnenberg H., Kritchevsky S.B., Hoeschele I., McCall C.E., Herrington D., Tracy R.P., Liu Y. (2014) Age-related variations in the methylome associated with gene expression in human monocytes and T cells. *Nat. Commun.* **5**, 5366.
  33. Wang B., Guo H., Yu H., Chen Y., Xu H., Zhao G. (2021) The role of the transcription factor EGR1 in cancer. *Front. Oncol.* **11**, 642547.
  34. Havis E., Duprez D. (2020) EGR1 transcription factor is a multifaceted regulator of matrix production in tendons and other connective tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(5), 1664.
  35. Trizzino M., Zucco A., Deliard S., Wang F., Barberi E., Veglia F., Gabrilovich D., Gardini A. (2021). EGR1 is a gatekeeper of inflammatory enhancers in human macrophages. *Sci. Adv.* **7**(3), eaaz8836.
  36. Duclot F., Kabbaj M. (2017) The role of Early Growth Response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 35.
  37. Senapati P., Miyano M., Sayaman R.W., Basam M., Trac C., Leung A., LaBarge M.A., Schones D.E. (2022) Normal mammary epithelia accumulate DNA methylation changes with age that are consistent with breast cancer methylomes. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.06.26.170043

## **Methylation of Selected CpG-Sites of the Gene *CSF1* as a Factor of Regulation of its Expression and a Marker of Human Biological Aging**

**A. D. Sergeeva<sup>1, \*</sup>, A. D. Perenkov<sup>1</sup>, M. V. Vedunova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,  
Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

*\*e-mail: a.d.sergeeva@yandex.ru*

Age-associated transformation of the methylation pattern is considered to be an important predictor of human biological age. Changes in the level of CpG-dinucleotide methylation contribute to a shift in the function of a number of genes, including those associated with the functioning of the immune system. One of such gene is *CSF1*. The protein product of this gene is associated with inflammatory aging, making it an important biomarker of age-related diseases. We studied the methylation profile of the promoter-associated CpG island of the *CSF1* gene by MALDI-TOF mass spectrometry. The dependences between the character of CpG-site methylation within the investigated regions and the relative level of the gene mRNA and its protein product in people of different age groups were searched. For two CpG sites, a high level of correlation with the studied parameters is shown. A search for the landing sites of transcription factor binding sites associated with gene transcription showed that these CpG dinucleotides are part of motifs for the NFI family transcription factors and the EGR1 factor. We hypothesize that these CpG sites play an important role in the regulation of *CSF1* gene expression.

**Keywords:** DNA methylation, age-depend changes, CpG-island, *CSF1* gene

## БЕЛОК p62: ПЕРЕСЕЧЕНИЕ ПУТЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И АУТОФАГИИ

© 2024 г. Г. А. ШИЛОВСКИЙ<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук,  
Москва, 127051 Россия

\*e-mails: gregory\_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

Поступила в редакцию 21.02.2024 г.

После доработки 20.04.2024 г.

Принята в печать 07.05.2024 г.

Многочисленные регуляторные каскады связывают программы ответа клетки на окислительный стресс, а также механизмы поддержания гомеостаза и клеточной жизнеспособности. В обзоре подробно рассмотрены молекулярные механизмы взаимодействия белка аутофагии p62 с защитными системами клетки, в первую очередь путем NRF2/KEAP1/ARE. Понимание путей кросс-регуляции системы антиоксидантной защиты и аутофагии способствует поиску перспективных молекулярных мишеней для профилактики и лечения заболеваний, связанных со старением.

**Ключевые слова:** NRF2, p62, аутофагия, регуляторная петля, KEAP1, старение, сестрины

**DOI:** 10.31857/S0026898424050036, **EDN:** HURISK

Сокращения: АФК — активные формы кислорода; ТФ — транскрипционный фактор; АКТ — протеинкиназа В; АМПК (5'-AMP-activated protein kinase) — АМФ-активируемая протеинкиназа; АР1 (activating protein 1) — активирующий белок 1; аРКС (atypical protein kinase C) — атипичная протеинкиназа С; ARE (antioxidant response element) — элемент антиоксидантного ответа; АТЕ1 (arginyl-tRNA transferase 1) — аргинил-тРНК-трансфераза-1; ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase 1/2) — протеинкиназа, регулируемая внеклеточными сигналами; FXR (farnesoid X receptor) — фарнезоидный X-рецептор; GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) — киназа гликогенсинтазы 3β; IKKβ — β-субъединица IκB-киназы; JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) — тирозинкиназа/преобразователь сигнала и активатор транскрипции; JNK (c-Jun N-terminal kinases) — киназы семейства MAPK; KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) — Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1; KIR (Keap-interacting region) — участок, взаимодействующий с Keap; LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3) — легкая цепь-3 ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B; LIR (LC3-interacting region) — участок, взаимодействующий с LC3; MAPK (mitogen-activated protein kinases) — активируемые митогенами протеинкиназы; mTOR (mammalian target of rapamycin) — серин/треониновая протеинкиназа, мишень рапамицина у млекопитающих; mTORC1/2 (mammalian target of rapamycin complex 1/2) — комплексы 1 и 2, содержащие mTOR; Neh (NRF2-ECH homology; ECH — аналог NRF2 у кур) — домен гомологии NRF2-ECH; NES (nuclear export signal) — сигнал экспорта из ядра; NFE (nuclear factor erythroid derived) — ядерный фактор эритроидного происхождения; NF-κB (nuclear factor κB) — ядерный фактор κB; NLS (nuclear localization signal) — сигнал внутриядерной локализации; NRF2 (NFE2-related factor 2) — транскрипционный фактор-2 семейства NFE; p38 MAPK (p38 mitogen activated protein kinase) — митогенактивируемые протеинкиназы, класс p38; p62/SQSTM1 (sequestosome 1) — убиквитинсвязывающий белок p62, или секвестосома-1; PB1 (Phox and Bem1) — домен Phox и Bem1; PGAM5 (phosphoglycerate mutase family, member 5) — серин/треониновая фосфатаза; PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) — фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC (protein kinase C) — протеинкиназа C; PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) — γ-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) — фосфатаза с двойной субстратной специфичностью; RBX1 (RING-box protein 1) — белок RING-box 1; SESN — сестрин; TAK1 (TGF-β-activated kinase 1) — активируемая TGF-β киназа-1; TBK1 (TANK-binding kinase 1) — TANK-связывающая киназа-1; TRAF6 (TNFα receptor-associated factor 6) — фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей α; βTrCP (β-transducin repeat containing protein) — белок, содержащий β-трансдуциновые повторы; UBA (ubiquitin associated) — ассоциированный с убиквитином (домен); ULK (ULK-51-like autophagy activating kinase) — активирующая аутофагию ULK-51-подобная киназа; UXT (ubiquitous expressed transcript) — универсально экспрессируемый транскрипт.

## ВВЕДЕНИЕ

У млекопитающих путь KEAP1/NRF2/ARE<sup>1</sup> (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1/транскрипционный фактор-2 семейства NFE/элемент антиоксидантного ответа) и аутофагия относятся к основным внутриклеточным системам защиты от окислительного стресса и поддерживают гомеостаз [1–3]. Транскрипционный фактор (ТФ) NRF2 первоначально был идентифицирован как главный регулятор редокс-гомеостаза, который управляет экспрессией набора генов, участвующих в смягчении окислительного и электрофильного стресса. Однако роль NRF2 в регулировании множества процессов реакции клетки на стресс гораздо шире. Так, показано, что NRF2 регулирует экспрессию генов, контролирующих ферроптоз – процесс гибели клеток, зависящий от перекисного окисления железа и липидов [2]. В настоящее время растет число работ, посвященных изучению не только классической роли NRF2 (индукции экспрессии генов, кодирующих белки системы антиоксидантной защиты и детоксикации), но и его участию в других клеточных процессах, включая воспаление [4], регуляцию циркадных биоритмов [5] и клеточную гибель, в том числе в условиях развития возрастных патологий [6, 7]. Выявлена множественность механизмов NRF2, влияющих на функцию эндотелиальных клеток, а также плюсы и минусы активации этого ТФ в эндотелии сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии [8]. Пока не получила однозначной оценки роль белка NRF2 в развитии атеросклероза: наряду с данными о его защитном действии, есть и предполагающие проатерогенную активность (см. обзор [8]).

Помимо известных положительных эффектов активации NRF2: снижение уровня окислительного стресса и воспалительной активации эндотелия, восстановление нормальной функции митохондрий, увеличение биодоступности NO за счет предотвращения разобщения eNOS, – известны и негативные: усиление экспрессии гена *NOX4*, кодирующего NADPH-оксидазу, ответственную за продукцию активных форм кислорода (АФК). Кроме того, роль NRF2 в канцерогенезе тоже двойственна. Этот белок вовлечен в механизмы, с одной стороны, защищающие нормальные клетки от мутагенеза и злокачественной трансформации, а с другой, тем самым способствующие выживанию уже имеющихся опухолевых клеток. Также способность NRF2 стимулировать ангиогенез вносит дополнительный вклад в прогрессирование опухолей, способствуя их васкуляризации [8]. В об-

зоре представлен всесторонний анализ данных о функциях белков, регулирующих аутофагию и сигнальный путь KEAP1/NRF2/ARE.

## СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ NRF2

Известно несколько уровней регуляции NRF2. Этот транскрипционный фактор обеспечивает адаптацию клетки к окислителям и электрофилам главным образом за счет вызванной стрессом модификации тиольных групп цистеина в одном из его репрессоров – KEAP1, входящего с убиквитинлигазой Cullin-3 RING (CRL) в состав комплекса CRL–KEAP1. Модификация остатков Cys в KEAP1 блокирует активность CRL–KEAP1, что приводит к накоплению *de novo* свежетранслированного NRF2 в ядре и индукции экспрессии генов-мишеней.

Основной путь стабилизации NRF2 в клетке – накопление белков, которые нарушают связь между KEAP1 и NRF2, конкурируя с ним за сайты связывания на KEAP1. Это важный для аутофагии белок p62, адаптерный белок Hrd1, белки p21, PALB2, PGAM5, WTX, IKK $\beta$  (регулятор пути NF- $\kappa$ B – ядерного фактора  $\kappa$ B). Все они содержат консервативный мотив E(S)T/L/NGE [9]. Показано присутствие KEAP1 в митохондриях, где он взаимодействует с белком PGAM5 [10, 11]. KEAP1 критически важен для поддержания митохондриального гомеостаза: p62 рекрутирует его в митохондрии и вместе с RBX1 опосредует убиквитинирование этих органелл клетки, предотвращая образование дисфункциональных мегамитохондрий и тем самым смягчая течение неалкогольной жировой болезни печени [12]. NRF2-ингибирующую активность проявляет и белок, содержащий  $\beta$ -трансдукционные повторы ( $\beta$ -TrCP), который входит в состав убиквитинлигазного комплекса SKP1–Cullin-1–F-box (SCF– $\beta$ -TrCP). Однако образование фосфодегрона в NRF2 с помощью киназы-3 гликогенсинтазы (GSK3) ингибируется стимулами, которые активируют протеинкиназу B (PKB)/АКТ. В частности, активность PKB/АКТ может быть усилена действием фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). Это позволяет объяснить, почему гены, управляемые антиоксидантзависимыми элементами (ARE), индуцируются факторами роста и питательными веществами [13].

## СИСТЕМА KEAP1–NRF2–ARE И АУТОФАГИЯ

Помимо окислительного (электрофильного) стресса система NRF2 может быть активирована через нарушение оборота белка [14]. Ре-

<sup>1</sup> Все гены и белки указаны по правилам написания для клеток человека, если это не оговорено особо.

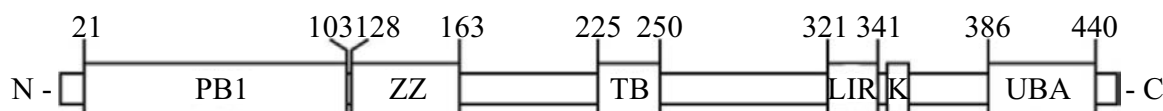
доксчувствительный сигнальный путь KEAP1–NRF2–ARE характеризуется функциональным взаимодействием с системой аутофагии [14, 15]. В регуляции NRF2 посредством аутофагии важную роль играет многофункциональный регуляторный цитоплазматический белок p62 (секвестосома-1, SQSTM1) [16]. Для p62-опосредованной индукции NRF2 необходимо увеличение концентрации p62, что повышает вероятность конкурентного вытеснения NRF2 из комплекса с KEAP1. Этот механизм, вероятно, работает при длительной активации NRF2 благодаря тому, что NRF2 повышает экспрессию p62, связываясь с ARE-содержащим промотором гена *SQSTM1*, кодирующего его. Таким образом, p62 – продукт гена-мишени NRF2, поэтому экспрессия этих белков связана петлей положительной обратной связи: накопление p62 способствует активации NRF2, а активированный NRF2 дополнительно повышает уровень p62 [15]. Увеличивающееся в результате количество белка p62 секвестрирует на себе KEAP1, а это, в свою очередь, стабилизирует NRF2 и поддерживает его активность [15]. Дегградация KEAP1 происходит посредством p62-зависимой аутофагии [17], чему способствует предшествующее его убиквитинирование [18]. Способность KEAP1 репрессировать NRF2 может быть ослаблена белком p62 с помощью механистической мишени для зависимого от рапамицина комплекса-1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1). Таким образом, у млекопитающих ось p62–NRF2 включает путь активации PI3K/АКТ и mTORC1. ТФ NRF2 положительно регулирует экспрессию mTOR [19]. Белок p62 взаимодействует с молекулами, которые взаимодействуют с mTOR и образуют комплекс mTORC1 [20]. mTORC1 способствует передаче сигналов роста клеток, а мутации в нем идентифицированы в нескольких типах опухолей человека [21].

Кроме того, цитопротекторное действие активированного NRF2 выходит за рамки классических генов-мишеней этого ТФ, так как продукты и других ARE-содержащих генов проявляют противовоспалительную активность [22] и вовлечены в протеасомную дегградацию окисленных белков [23].

Нарушение аутофагии в печени препятствует обороту p62, вызывая тяжелое повреждение этого органа. Процесс сопровождается образованием телец включения, содержащих p62, KEAP1 и убиквитинированные белки, и приводит к усилению экспрессии генов-мишеней NRF2 [14]. Эта модель повреждения печени может быть скомпенсирована путем удаления NRF2. Следовательно, конститутивная активация NRF2 в состоянии дефектной селективной аутофагии вредна для функциональной целостности гепатоцитов. Также показано, что система NRF2/ARE задействована в передаче сигналов гибели гепатоцитов, в том числе путем ферроптоза [24].

### СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ p62 (*SQSTM1*)

Белок p62 содержит 6 консервативных доменов, которые взаимодействуют с белками различных сигнальных систем (рис. 1). Это домен PB1 (содержит мотивы Phox и Bem1p), домен “цинкового пальца” ZZ-типа (ZZ), TRAF6-связывающий домен (TB), LC3-взаимодействующий домен (LIR), взаимодействующий с KEAP1 домен KIR и убиквитинсвязывающий домен UBA (ubiquitin associated). N-концевой домен PB1 p62 образует олигомеры и димеры с другими белками, включая aPKC (atypical protein kinase C) и ERK (extracellular signal-regulated protein kinase). Домен ZZ представляет структуру типа “цинковые пальцы”, что позволяет p62 выступать в качестве ТФ и связываться с ДНК. Посредством TB-домена p62 связывается с фактором TRAF6 (TNF- $\alpha$  receptor-associated factor 6) и активирует NF- $\kappa$ B, модулируя таким образом процесс воспаления. С-концевые домены LIR (ATG8/LC3-interacting region), KIR (Keap-interacting region) и UBA служат для связывания KEAP1 и убиквитинированных белков, а также их дегградации посредством аутофагии. Домен KIR сходен по структуре с ETGE-последовательностью NRF2, что позволяет p62 взаимодействовать с KEAP1 и тем самым нарушать ассоциацию NRF2 с KEAP1 и его последующее убиквитинирование. Кроме того, взаимодействие p62 с KEAP1 приводит к дегградации последнего по пути аутофагии [26].



**Рис. 1.** Структурная организация белка p62. Доменная структура белка p62 человека (440 а.о.): 21–103 а.о. – домен PB1 (содержит мотивы Phox и Bem1p); 128–163 а.о. – домен “цинкового пальца” ZZ-типа (ZZ); 225–250 а.о. – TRAF6-связывающий домен TB; 321–341 а.о. – LC3-взаимодействующий домен (LIR); 346–359 а.о. – взаимодействующий с KEAP1 домен KIR (K); 386–440 а.о. – убиквитинсвязывающий домен (UBA).

Белок p62 вовлечен в сигналинг процесса аутофагии за счет домена LIR, который непосредственно взаимодействует с маркером аутофагии LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) [27]. LIR связывается с белком ATG8/LC3 [25], который локализуется на мембранах аутофагосом. В результате рекрутируемые p62 “грузы” заключаются в аутофагосомы. Показано, что белок p62 чувствителен к окислительному стрессу, что способствует активации аутофагии [28].

В составе p62 есть сайты связывания многих других функционально важных для клетки белков: убиквитина, KEAP1 и других. Это позволяет p62 конкурировать с NRF2 за связывание с KEAP1 и активацию пути NRF2 [14, 26]. p62 связывается с убиквитином через С-концевой UBA-домен, рекрутируя полиубиквитинированные белки. Показано участие p62 в качестве рецептора при многих формах селективной аутофагии [29]. Можно выделить два типа аутофагии: микро- и макроаутофагию. Первый — аутофагия, опосредуемая шаперонами (CMA, chaperone-mediated autophagy), — запускается при активном участии шаперона HSC70 и направляет определенные белки в лизосому для уничтожения. HSC70 направляет белок, подлежащий удалению, к рецептору LAMP-2A на поверхности лизосомы. Второй тип аутофагии связан с образованием мембранной структуры (аутофагосомы) вокруг той части клетки, которую предполагается удалить. В этом процессе основную роль играют белки семейства ATG, один из них — LC3 (ATG8) — служит маркером начала аутофагии [30].

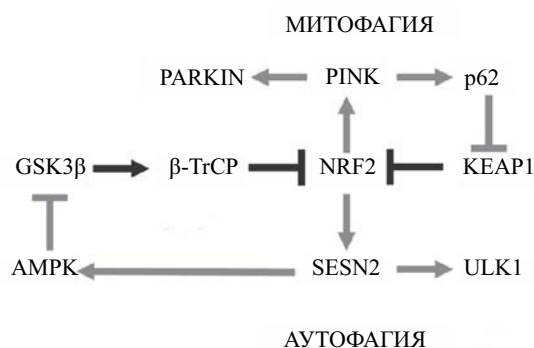
Неселективная аутофагия происходит в клетке, страдающей от дефицита питательных веществ. В этой ситуации избирательная аутофагия служит для выборочного удаления органелл с целью регулирования их количества. Митофагия — частное проявление избирательной митохондриальной аутофагии [31]. Митофагия зависит от PTEN-индуцированной киназы-1 (PINK1). PINK1 содержит нацеленную на митохондрии последовательность (MTS). При отсутствии митохондриального повреждения PINK1 проникает в эти органеллы через внешнюю мембрану (через комплекс TOM) и частично через внутреннюю мембрану (через комплекс TIM). На внутренней мембране PINK1 подвергается частичному расщеплению с образованием ассоциированного с пресенилином ромбовидного белка (PARL). Эта форма PINK1 расщепляется протеазами митохондриального матрикса [32]. В поврежденных митохондриях внутренняя мембрана деполяризована, что влияет на импорт белка, опосредованный TIM. В результате белок PINK1 не попадает в митохондриальный матрикс, где он обычно разрушается, а нака-

пливается на внешней мембране митохондрий. Это приводит к активации цитозольной E3-убиквитинлигазы PARKIN, которая, убиквитинируя белки на внешней мембране митохондрий, запускает митофагию (рис. 2). PARKIN способствует K63-ассоциированному полиубиквитинированию митохондриального субстрата и рекрутирует убиквитин- и LC3-связывающий белок p62 в митохондрии [33].

Комплекс, включающий киназу RIP, атипичную протеинкиназу C, фактор TRAF6 и убиквитинлигазу K63, играет критическую роль в фосфорилировании IKK $\beta$ , важном для активации ТФ NF- $\kappa$ B [34]. Обнаружено, что высокий уровень p62 коррелирует с повышенной продукцией интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Оказалось, что p62 связывает киназы JNK и ERK, тем самым усиливая активацию NF- $\kappa$ B и, как следствие, экспрессию IL-1 $\beta$ . Кроме того, накопление p62 способствует активации каспазы-1 в инфламасомах, которая необходима для протеолитического процессинга IL-1 $\beta$  [35].

Белок p62 действует как адаптерная молекула, которая напрямую взаимодействует с убиквитинированными молекулами на аутофагосоме. Удаление p62 полностью блокирует клиренс поврежденных митохондрий [36]. Таким образом, активация оси PINK1/PARKIN/p62 (рис. 2) играет важную роль в селективном устранении поврежденных митохондрий, что важно для поддержания контроля их качества. Следует отметить, что что p62-опосредованное убиквитинирование и митофагия также могут идти по PINK1/PARKIN-независимому пути [37].

Известны два пути конъюгации убиквитинподобных белков, которые необходимы для



**Рис. 2.** Пути регуляции NRF2 при митофагии и аутофагии. Представлена упрощенная схема, состоящая из регуляторной петли, включающей p62, KEAP1 и NRF2, и другой регуляторной петли, включающей AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), SESN2 (sestrin 2), ULK1 (UNC-51-like autophagy activating kinase 1). Стрелкой обозначено прямое стимулирующее воздействие, включая катализ; линией с тупым концом обозначено ингибирующее/супрессорное действие на активность/экспрессию NRF2.

биогенеза аутофагосом. Это системы ATG12-ATG5-ATG16 и ATG8. Считалось, что аутофагия, по существу неселективный процесс, частично избирательна. Селективные субстраты аутофагии включают поврежденные митохондрии, внутриклеточные патогены и даже подмножество цитозольных белков, распознаваемых с помощью убиквитинсвязывающих адаптеров аутофагии, таких как p62, NBR1, NDP52, TAX1BP1 и Optineurin. Эти белки избирательно распознают аутофагический груз и опосредуют его поглощение аутофагосомами, связываясь с небольшими убиквитинподобными модификаторами, которые принадлежат к семейству ATG8/LC3 [38, 39]. Среди этих белков p62 лучше всего охарактеризован как опосредующий аутофаговый клиренс полиубиквитинированных грузов, таких как агрегированные белки [40].

Другой адаптер, используемый в селективной аутофагии, — NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1), который через свой домен PB1 взаимодействует с p62, а через домены UBA и LIR участвует в рекрутинге и аутофагосомной деградации убиквитинированных белков [25]. Optineurin и NDP52 описаны как рецепторы ксенофагии, использующие аппарат аутофагии для убиквитинированных внутриклеточных патогенов [41]. Оба эти адаптера участвуют в клиренсе белковых агрегатов [42, 43] и необходимы для регуляции передачи сигналов NF- $\kappa$ B [44]. Хотя все эти рецепторы опосредуют деградацию убиквитинированных белков, известны и более специфические адаптеры, действующие на удаление поврежденных или избыточных митохондрий (например, Atg32 дрожжей и NIX млекопитающих) или пероксисом (например, Atg30 и Atg36 дрожжей). Они распознают конкретных партнеров по связыванию на поверхности своей органеллы-мишени и через домен LIR обеспечивают их доставку к созревающей аутофагосоме [33]. Филогенетический анализ и анализ сети взаимодействий выявили, что функция белков ATG эволюционно консервативна даже у растений рода *Arabidopsis* и люцерны *Medicago truncatula* [45]. У растений функциональный гибридный гомолог p62 и NBR1 (NBR1 у *Arabidopsis*, Joka2 у *Nicotiana*) играет важную роль в утилизации полиубиквитинированных белков, накопленных в условиях абиотического стресса [46, 47].

### РОЛЬ p62 В ФОРМИРОВАНИИ АУТОФАГОСОМ

Известно, что прямое взаимодействие между p62 и убиквитином довольно слабое, поэтому образование полиубиквитинированных агрегатов начинается с аутоолигомеризации p62 через его домен PB1 [29]. Однако выдвинутая первоначально “простая” концепция доставки

предназначенных к деградации белковых агрегатов посредством соединения боковой цепи полиубиквитина на грузе и укрепления ATG8/LC3 на поверхности фагофора с помощью p62 впоследствии оказалась более сложной. Оба взаимодействия: домен UBA—убиквитин и мотив LIR—ATG8 — слабые.

Низкая аффинность домена UBA к убиквитину частично обусловлена его гомодимеризацией, которая взаимоисключает связывание убиквитина [48]. Это сродство может быть усилено за счет фосфорилирования S403 в домене UBA киназой-2 (casein kinase 2, CK2) и TANK-связывающей киназой-1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) [49]. Ингибирование фосфорилирования S403 p62 способствует образованию перинуклеарных агрегатов убиквитинированных белков, что является важным защитным механизмом клетки при протеасомной дисфункции. Фосфорилирование T269/S272 в белке p62 ингибирует фосфорилирование по S403, усиливая образование агрегатов убиквитинированного белка и защищая клетки от протексического кризиса [49].

Мотив LIR p62 представлен последовательностью DDDWTHL и связывается с LC3B в микромольном диапазоне концентраций [40]. Олигомеризация, опосредованная доменом PB1, позволяет p62 сильно и селективно связываться с грузами, включая белки с неправильной укладкой, на которых концентрируется убиквитин [50]. Сходный эффект наблюдается для взаимодействия LIR—LC3B, где опосредованная PB1 олигомеризация приводит к взаимодействию с очень высоким сродством с концентрированными на мембране LC3, так что скорость диссоциации становится практически нулевой [50]. Это тесное взаимодействие позволяет p62 изгибать мембраны вокруг груза, и это свойство сохраняется у Atg19 дрожжей [50]. Фактически, эти агрегаты, содержащие p62 и убиквитинированные белки, могут служить исходным каркасом для биоге́неза аутофагосом — потенциально за счет связывания нескольких белков ATG [29, 51]. Более того, сообщалось, что фагофоры могут преимущественно формироваться в агрегатах p62 рядом с лизосомами в клетках *Drosophila melanogaster*, что похоже на расположение PAS (phagophore assembly site) рядом с вакуолью/лизосомой у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [52]. Белок p62 также взаимодействует с mTORC1 [53]. Последний связывается с лизосомами, способствуя росту клеток и ингибируя аутофагию путем фосфорилирования ATG1 (ULK1/2) [54, 55]. Затем ATG8/LC3 рекрутируется на формирующийся фагофор и взаимодействует с p62 и другими белками, образуя p62-содержащий агрегат, окруженный двойной мембраной [56]. Также с ATG1/ULK1 взаимодействует деубик-

витиназа Leon/USP5, тем самым негативно регулируя процесс аутофагии [57].

### РОЛЬ p62 В РЕГУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ

Еще в 2011 году А. Duran с соавт. [19] сообщали, что активация комплекса mTORC1 способствует его транслокации на поверхность лизосомы, из чего делали вывод, что снижение уровня p62, как и инактивация mTORC1, могут активировать аутофагию. Однако позднее J. Zhou и др. [46] показали, что в клетках HEK293 и HeLa белок p62 высвобождает Beclin1 (гомолог ATG6) путем разрушения ассоциации BCL-2 с Beclin1 и тем самым положительно регулирует индукцию аутофагии [46]. Кроме того, p62 взаимодействует и регулирует деацетилазную активность HDAC6 (histone deacetylase 6) – модификатора F-актиновой сети, участвующей в селективной аутофагии [58].

В клетках карциномы сайленсинг гена *SQSTM1*, кодирующего p62, приводил к появлению аномальных аутофагосом и в итоге к аутофагической гибели клеток [59]. Таким образом, роль p62 в индукции аутофагии оказывается сложной и, вероятно, зависит от конкретных условий. Белок p62 может перемещаться между ядром и цитоплазмой и даже экспортировать убиквитинированные субстраты из ядра в цитозоль – где аутофагия проходит наиболее интенсивно [60].

Многочисленные клеточные органеллы, такие как ядрышки, Р-гранулы, стресс-гранулы и PML-тельца, – это достаточно стабильные образования. Предполагается, что многие из этих безмембранных органелл формируются на границе раздела фаз, где идет конденсация высокомолекулярных соединений (белков, РНК и ДНК) с образованием крупных агрегатов [61–63]. Выяснилось, что не только органеллы, но и образование временных клеточных конденсатов (puncta) также происходит на границе раздела фаз [64]. В этих конденсатах биомолекулы проявляют неодинаковую подвижность, что придает разным конденсатам различные физические свойства. Конденсаты, образующиеся на границе раздела фаз “жидкость–жидкость”, характеризуются высокой подвижностью макромолекул, сконцентрированных внутри этих структур [61, 62]. Хотя точные молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования раздела фаз “жидкость–жидкость”, до сих пор не совсем ясны, похоже, что это явление основано на низкоаффинном мультивалентном взаимодействии макромолекул [61]. Наличие неструктурированных областей, также способствует разделению фаз “жидкость–жидкость” [65]. Интересно, что именно такими свойствами

обладают нитевидные олигомеры цепей p62 и убиквитина. С одной стороны, убиквитин-связывающий домен UBA p62 взаимодействует с убиквитином с микромолярной аффинностью и связан с остальной частью белка p62 через длинную неструктурированную область. С другой стороны, цепи убиквитина содержат множество сайтов взаимодействия для p62 [66].

### УРОВНИ РЕГУЛЯЦИИ p62

Регуляция p62 осуществляется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Транскрипция гена *SQSTM1* регулируется ТФ NF-κB, AP-1 и FXR (фарнезоидный X-рецептор) [67]. Кроме того, этот ген – мишень NRF2. Ген *SQSTM1* содержит ARE в области –1306...–1295 п.н., формируя тем самым петлю положительной обратной связи [15]. Убиквитинирование белка KEAP1 усиливает его взаимодействие с p62, хотя наибольший вклад в него вносят белки семейства Sestrin (сестрины) [68, 69]. Наличие в промоторе гена *SESN2* (кодирует белок Sestrin 2, SESN2) последовательности ARE усиливает его активирующее действие на систему KEAP1/NRF2/ARE (по механизму положительной обратной связи) [68] (рис. 2). Белок SESN2 способен образовывать комплексы с p62 и KEAP1, а также ингибировать mTORC1, что активирует аутофагию. SESN2 способствует митофагии – специфической форме аутофагии, – либо ингибируя mTORC1, либо используя другие механизмы, такие как взаимодействие с рецептором аутофагии p62 и E3-убиквитинлигазой RBX1 [70, 71].

Механизм активации аутофагии и митофагии сестринами включает ингибирование mTORC1 и активацию ULK1, что способствует снижению уровня АФК и удалению дисфункциональных митохондрий. ULK1 фосфорилирует SESN2, вызывая митофагию, а фосфорилированный SESN2 активирует ULK1, дополнительно индуцируя аутофагию по механизму положительной обратной связи (рис. 2).

Сестрины усиливают чувствительность к инсулину, блокируя сигнальный путь киназ mTORC1 и p70S6K1 (ribosomal protein S6 kinase B1), ответственный за деградацию белка IRS1 (insulin receptor substrate 1), необходимого для передачи сигнала от инсулинового рецептора к PI3K с последующей активацией киназ PDK1 и mTORC2 и фосфорилированием АКТ. Повышение уровня экспрессии SESN2 стимулирует активацию АМПК и ингибирование mTORC1, поддерживая высокую активность АКТ и способствуя супрессии глюконеогенеза и снижению уровня сахара в крови [72]. Кроме того, сестрины подавляют накопление липидов и стресс эн-

доплазматического ретикулула посредством ингибирования mTORC1 за счет активации AMPK и связывания GATOR2 (GAP activity towards Rags 2) [69, 73]. Помимо общей регуляции процесса аутофагии, SESN2 также контролирует специфическое расщепление белков в лизосомах. Показано, что AMPK активирует NRF2 путем ингибирования GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) [74]. Конвергенция между путями AMPK и NRF2 важна, например для механизма противовоспалительного действия берберина на макрофаги, стимулированные липополисахаридом, и мышей, подвергшихся эндотоксиновому шоку [75]. Активация AMPK приводит к перепрограммированию метаболизма на усиление катаболизма и снижение анаболизма путем фосфорилирования ключевых факторов во многих биосинтетических путях, в том числе mTOR [76, 77]. К активаторам AMPK относится и известный опухолевый супрессор серин/треониновая киназа 11 (serine/threonine kinase 11, STK11), или LKB1 (liver kinase B1) [78–80]. В экспериментах с тканеспецифичными нокаутами гена *Lkb1* у мышей показано, что в большинстве тканей именно белок Lkb1 — главный посредник в адаптивной активации AMPK при энергетическом стрессе. На основании этих результатов авторы делают вывод о наличии связи между регуляцией энергетического метаболизма и супрессией опухолей [78, 79].

SESN2 играет важную роль в регуляции митофагии при воспалении и сепсисе. Так, этот сестрин контролирует узнавание и доставку поврежденных фрагментов митохондрий в аутофагосомы, взаимодействуя с белком p62 — переносчиком субстратов для аутофагосом [81]. Посредством взаимодействия с белками KEAP1, p62 и RBX1 сестрины вызывают деградацию KEAP1 с последующей активацией NRF2 [70]. Белок SESN2, связываясь с NRF2, не только регулирует стабильность последнего, но также поддерживает его транскрипционную активность в ядре [82]. В некоторых типах клеток, например в почечных клубочках, SESN2 выполняет антиоксидантную функцию, снижая экспрессию NOX4 [83].

Как отмечалось выше, мотивы E(S)T/L/NGE и мотив <sup>349</sup>STGE<sup>352</sup> p62 в частности, сходны с KEAP1-связывающим мотивом <sup>79</sup>ETGE<sup>82</sup> NRF2. Следовательно, p62 может конкурировать с NRF2 за связывание KEAP1. Когда аутофагия нарушается, уровень p62 повышается, что приводит к деградации KEAP1 и, как следствие, к стабилизации NRF2 [14]. Взаимодействие между KEAP1 и p62 происходит после фосфорилирования мотива STGE в p62, которое могут выполнять mTORC1 [84] или TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) [85, 86]. Увеличение отрицательного заряда этой последовательности (при фосфори-

ровании серина) делает возможным взаимодействие с положительно заряженными остатками домена Kelch KEAP1. Аффинность KEAP1 к домену KIR p62 немного ниже, чем к DLGex (последовательность M17–Q51 в NRF2, важная для взаимодействия с KEAP1), и существенно ниже, чем к ETGE-последовательности NRF2 [14], поэтому структурное сходство KEAP1-связывающих последовательностей p62 и NRF2 не играет роли при классической активации системы NRF2/KEAP1/ARE электрофильными соединениями. Как отмечалось, для p62-опосредованной индукции экспрессии NRF2 необходимо увеличение концентрации p62, что повышает вероятность конкурентного вытеснения DLGex NRF2 из комплекса с KEAP1. Этот механизм, вероятно, работает лишь при длительной активации NRF2 благодаря тому, что NRF2 повышает экспрессию p62, связываясь с промотором гена, кодирующего p62. В результате многочисленные молекулы белка p62 секвестрируют на себе KEAP1, а это, в свою очередь, стабилизирует NRF2 и поддерживает активность последнего [15]. Фосфорилирование p62 по S349 у человека (позиция S351 в p62 мыши) существенно увеличивает его аффинность к KEAP1, которая становится выше, чем сродство KEAP1 к ETGE-мотиву NRF2 и тем более к DLGex [84]. Такая модификация возможна после предварительного фосфорилирования p62 по позиции S403 киназой TBK1 и последующего формирования агрегатов p62 друг с другом и с убиквитинированными мишенями. Эти агрегаты служат, с одной стороны, мишенями для аутофагии, а с другой — сайтами секвестрирования KEAP1, в результате чего происходит индукция NRF2/ARE [84]. Белок KEAP1 способствует очищению клетки от агрегатов убиквитина посредством аутофагии, где он взаимодействует с p62 и LC3. В ответ на селективную аутофагию KEAP1 перемещается в тельца включения после взаимодействия с p62 [15]. KEAP1 колокализуется с p62, что способствует деградации KEAP1 [87]. Взаимодействие между p62 и KEAP1 усиливается, когда p62 подвергается фазовому разделению (и появляется как включение [puncta]), управляемому цитоплазматическим белком DAXX (death-associated protein 6) [88]. Мутация в KIR-домене p62, которая отменяет взаимодействие KEAP1 с p62, имеет место при различных патологиях, например при боковом амиотрофическом склерозе [89].

Кроме того, KEAP1 взаимодействует с регулятором аутофагии ATG5 [90]. Также показано прямое взаимодействие KEAP1 с протеасомными субъединицами PSMD2, PSMD4 и сегрегазой Vcp/p97 [9] — негативным регулятором стабильности NRF2 [91]. Выявлен ряд мутаций KEAP1, носящих общее название ANCHOR (additionally

NRF2-complexed hypomorph), сильно влияющих на ассоциацию с NRF2 и приводящих к стабилизации третичной структуры KEAP1 и образованию р62-зависимых фазоворазделенных сферических кластеров. Эти кластеры содержат KEAP1-положительное ядро, окруженное немодифицированным и фосфорилированным р62, полиубиквитином и NRF2. Эти исследования позволяют лучше понять молекулярные механизмы регуляции и субклеточной локализации KEAP1, а также влияния мутаций на конформационный цикл KEAP1 и транскрипцию генов-мишеней NRF2 [9].

Еще один способ регуляции аутофагии с участием р62 — аргинилирование N-конца белков [92]. В дополнение к созданию субстратов, несущих N-дегрон и предназначенных для протеолиза, N-концевое аргинилирование может запустить селективную макроаутофагию посредством активации аутофагического N-рекогнина и р62 [93, 94]. Y. Zhang с соавт. [95] и H. Cha-Molstad с соавт. [96] показали, что N-концевой аргинин белков (N-дегрон) связывает домен ZZ р62, что облегчает их удаление. Кроме того, аргинилтрансфераза ATE1 (arginyl-tRNA transferase 1) и р62 кластеризуются вместе со своими грузами. Можно предположить, что кластер ATE1 и сборка телец р62 могут быть одним из механизмов, с помощью которого этот фермент облегчает аргинилирование и последующую аутофагическую переработку накопленных субстратов [97]. При липофагии связанные с N-концевым Arg белки р62 подвергаются аутополимеризации и рекрутируют фагофоры LC3+ в место лизосомной деградации липидных гранул. У мышей со специфичным для печени нокаутом гена *Ate1* при диете с высоким содержанием жиров развивалась тяжелая неалкогольная жировая болезнь печени. Низкомолекулярные агонисты р62 облегчали липофагию и оказывали терапевтическое действие при ожирении и гепатостеатозе у мышей дикого типа, но не у мышей с нокаутом гена р62 (*Sqstm1*) [98].

Показано, что белок UXT (ubiquitous expressed transcript) может способствовать селективной аутофагии, опосредованной р62 [99, 100]. UXT связывается с белковыми агрегатами, а также с PB1-доменом р62, образуя олигомер и тем самым увеличивая кластеризацию р62 для его эффективного нацеливания на белковые агрегаты и способствуя образованию р62-телец и их выведению посредством аутофагии [99, 101]. Кроме того, UXT-V2 (короткая изоформа UXT, состоящая из 157 а.о., тогда как UXT-V1 имеет на N-конце на 12 а.о. больше) специфически взаимодействует со STING1 (stimulator of interferon response cGAMP interactor 1) — основным адаптерным белком сигнального пути cGAS (cyclic GMP-AMP synthase)/STING1 [101].

Однако чрезмерная или длительная активация STING1 ассоциирована с аутовоспалительными и аутоиммунными заболеваниями. Таким образом, предотвращение чрезмерной активации STING1 важно для поддержания иммунного гомеостаза. В то же время известно, что STING1 избирательно разрушается при аутофагии посредством взаимодействия с р62 [100]. Yoon и соавт. [99] показали, что в модельной системе *Xenopus* эктопическая экспрессия UXT человека задерживает индуцированную мутированной формой SOD1 (superoxide dismutase 1) дегенерацию мотонейронов, а специфическое нарушение взаимодействия между UXT и р62 ингибирует UXT-опосредованную защиту. На основании этих результатов можно предполагать, что UXT функционирует как адаптер р62-зависимой аутофагии [99]. Другая изоформа UXT, UXT-V2, действует как кофактор транскрипции, который взаимодействует с белком р65, входящим в состав ответственной за развитие воспаления транскрипционной энхансомы NF-κB. Снижение уровня эндогенного UXT-V2 приводит к усилению апоптоза, индуцированного TNF-α [101, 102].

Соединения, которые повышают уровень р62, такие как рапамицин [103] и трегалоза [104], проходили клинические испытания фазы II и III как потенциальные препараты для лечения сахарного диабета, системной красной волчанки и аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек. Еще одно лечебное воздействие, голодание, приводит к увеличению активности AMPK и ингибированию mTORC1, которые, предположительно, уменьшают фосфорилирование S351 в STGE-мотиве р62 и сводят к минимуму опосредуемую аутофагосомами деградацию KEAP1. Возобновление диеты с высоким содержанием углеводов после голодания увеличивает деградацию KEAP1 благодаря совместному действию р62 и SESN1/SESN2, что приводит к индукции генов-мишеней NRF2 [70].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аутофагия отвечает за деградацию внутриклеточных белков и поврежденных органелл в ответ на эндогенные и экзогенные стрессы, включая окислительный, гипоксический, эндоплазматического ретикулума, а также голодание, вызванное недостатком питательных веществ и факторов роста [105–107]. Окислительный стресс — это не только причина дисфункции митохондрий, но и следствие сбоя в работе системы контроля качества митохондрий. Дисбаланс возникает при дисрегуляции митохондриального биогенеза и митофагии [108]. В условиях подавления биогенеза и активации митофагии

возникает дефицит энергии. И наоборот, при подавлении митохондриальной биогенеза в клетке накапливается большое количество поврежденных митохондрий, которые продуцируют высокие уровни АФК и при этом не удовлетворяют энергетические потребности из-за нефункциональной дыхательной цепи [109]. В этом случае клетку может “выручить” белок NRF2, который, образуя регуляторные петли, участвует в митохондриальном биогенезе. Так, NRF2 усиливает экспрессию PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator) — главного регулятора митохондриального биогенеза — и NRF1 (nuclear respiratory factor 1), которые регулируют транскрипцию митохондриальной ДНК. PGC-1 $\alpha$ , в свою очередь, дезактивирует GSK3 $\beta$  через p38 [110], что блокирует один из путей инактивации NRF2 (рис. 2). Блокирование второго пути инактивации NRF2 включает взаимодействие с p62, который взаимодействует с ингибитором NRF2 — KEAP1. Однако регуляция митохондриальной биогенеза белком NRF2 этим не ограничивается. Этот ТФ регулирует экспрессию белка PINK1, который играет ключевую роль в индукции митохондриальной биогенеза, а “работала” на поддержания динамического баланса, обеспечивающего стабильность митохондрий [111, 112].

Как по отдельности, так и вместе, пути передачи сигналов p62 и NRF2 тесно связаны с выживаемостью клеток [113, 114]. С одной стороны, они могут защищать ткань от дегенерации, в том числе возрастзависимой [115, 116]. Учитывая, что убиквитин играет ключевую роль в элиминации неправильно свернутых и агрегированных белковых молекул, S. Ma с соавт. [117] рассматривают p62 как перспективную мишень для модуляции протеасомных путей. Так, снижение экспрессии или инактивация гена p62 (*Sqstm1*) у мышей вызывало симптомы, подобные болезни Альцгеймера (ухудшение рабочей памяти), и приводило к гиперфосфорилированию tau-белка, образованию нейрофибриллярных клубков и нейродегенерации [118]. Сходные результаты наблюдали на модели крыс с болезнью Альцгеймера, индуцированной введением в гиппокамп белка-предшественника  $\beta$ -амилоида APP (amyloid precursor protein) — экспрессия p62 была снижена в мозге этих животных [119]. Усиление экспрессии p62 приводило к снижению уровня  $\beta$ -амилоида и улучшению когнитивных способностей у мышей APP/PS1 (модель болезни Альцгеймера) [1, 120].

С другой стороны, на животных моделях показано, что активация оси p62—KEAP1—NRF2 может приводить к развитию злокачественных

опухолей, в частности к гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК), за счет увеличения продукции UDP-глюкуроната и глутатиона [121, 122]. Рассматривают несколько механизмов индуцированного p62 и NRF2 канцерогенеза при ГЦК. Это мутации в генах *NFE2L2* (NRF2) и *KEAP1* [123], а также хроническое воспаление [4, 124], которое вызывает конститутивную активацию NRF2 и стабильную сверхэкспрессию p62 [125]. Кроме того, некоторые патологические состояния сопровождаются накоплением aberrantного p62 и возможным ослаблением аутофагии. Эти алкогольный/неалкогольный стеатогепатит, болезнь Вильсона—Коновалова и первичный билиарный холангит [126–129]. Поскольку накопленный p62 взаимодействует с KEAP1, приводя к накоплению NRF2, цитопротекторные гены-мишени NRF2 должны быть высокоэкспрессированы в этих патологических условиях.

Опухолевые клетки, наряду с накоплением p62, экспрессируют высокие уровни генов-мишеней NRF2 [130]. Учитывая, что повышенная экспрессия генов-мишеней NRF2 способствует выживанию клеток (в том числе и трансформированных), логично ожидать неблагоприятный прогноз у пациентов с p62-положительными злокачественными опухолями. Интересно, что в опухолевых клетках фосфорилирование p62 под действием комплекса mTORC1 усиливает его сродство к KEAP1 (то есть “оттягивает на себя” белок-ингибитор NRF2). Таким образом, активность mTORC1 дополнительно усиливает стабилизацию NRF2 и транскрипцию его генов-мишеней [84]. Регуляторную петлю p62—NRF2 уже рассматривают как перспективную мишень для фармакологического вмешательства [131, 132], в том числе для разработки препаратов, направленных на подавление развивающихся с возрастом нейродегенеративных процессов, приводящих к болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и другим патологиям.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-44-00099 (<https://rscf.ru/project/24-44-00099/>).

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. Zhang W., Feng C., Jiang H. (2021) Novel target for treating Alzheimer’s diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. *Ageing Res. Rev.* **65**, 101207. doi: 10.1016/j.arr.2020.101207

2. Shaky A., McKee N.W., Dodson M., Chapman E., Zhang D.D. (2023) Anti-ferroptotic effects of Nrf2: beyond the antioxidant response. *Mol. Cells*. **46**, 165–175. doi: 10.14348/molcells.2023.0005
3. Baykal-Köse S., Efe H., Yüce Z. (2021) Аутофагия не влияет на ответ линии клеток хронического миелоидного лейкоза, устойчивой к иматинибу, на ингибиторы тирозинкиназ. *Молекуляр. биология*. **55**(4), 626–633. doi: 10.31857/S002689842104004
4. Зиновкин Р.А., Гребенчиков О.А. (2020) Активация транскрипционного фактора Nrf2 как подход к предотвращению цитокинового шторма при COVID-19. *Биохимия*. **85**(7), 978–983. doi: 10.31857/S0320972520070118
5. Шиловский Г.А., Путятин Т.С., Моргунова Г.В., Селиверстов А.В., Ашапкин В.В., Сорокина Е.В., Марков А.В., Скулачев В.П. (2021) Регуляция белков циркадных ритмов и nrf2-опосредованной антиоксидантной защиты: двойная роль киназы гликогенсинтазы 3. *Биохимия*. **86**(4), 511–528. doi: 10.31857/S0320972521040059
6. Зиновкин Р.А., Кондратенко Н.Д., Зиновкина Л.А. (2022) Является ли Nrf2 основным регулятором старения млекопитающих? *Биохимия*. **87**(12), 1842–1855. doi: 10.31857/S0320972522120053
7. Шиловский Г.А. (2022) Лабильность защитной системы клетки Nrf2/Keap/ARE в различных моделях клеточного старения возрастных патологиях. *Биохимия*. **87**(1), 86–103. doi: 10.31857/S0320972522010067
8. Кондратенко Н.Д., Зиновкина Л.А., Зиновкин Р.А. (2023) Транскрипционный фактор NRF2 в функционировании эндотелия. *Молекуляр. биология*. **57**(6), 1058–1076. doi: 10.31857/S0026898423060101
9. Cloer E.W., Siesser P.F., Cousins E.M., Goldfarb D., Mowrey D.D., Harrison J.S., Weir S.J., Dokholyan N.V., Major M.B. (2018) p62-dependent phase separation of patient-derived Keap1 mutations Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **38**(22), e00644–17. doi: 10.1128/MCB.00644-17
10. Lo S.-C., Hannink M. (2006) PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 37893–37903. doi: 10.1074/jbc.M606539200
11. O’Mealey G.B., Plafker K.S., Berry W.L., Janknecht R., Chan J.Y., Plafker S.M. (2017) A PGAM5-Keap1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking. *J. Cell Sci.* **130**, 3467–3480. doi: 10.1242/jcs.203216
12. Yamada T., Murata D., Adachi Y., Itoh K., Kameoka S., Igarashi A., Kato T., Araki Y., Haganir R.L., Dawson T.M., Yanagawa T., Okamoto K., Iijima M., Sesaki H. (2018) Mitochondrial stasis reveals p62-mediated ubiquitination in PARKIN-independent mitophagy and mitigates nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* **28**, 588–604.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.014
13. Rada P., Rojo A.I., Evrard-Todeschi N., Innamorato N.G., Cotte A., Jaworski T., Tobón-Velasco J.C., Devijver H., García-Mayoral M.F., Van Leuven F., Hayes J.D., Bertho G., Cuadrado A. (2012) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/β-TrCP axis. *Mol. Cell. Biol.* **32**(17), 3486–3499. doi: 10.1128/MCB.00180-12
14. Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y., Sou Y.S., Ueno I., Sakamoto A., Tong K.I., Kim M., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Ueno T., Kominami E., Motohashi H., Tanaka K., Yamamoto M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* **12**(3), 213–223. doi: 10.1038/ncb2021
15. Jain A., Lamark T., Sjøttem E., Larsen K.B., Awuh J.A., Øvervatn A., McMahon M., Hayes J.D., Johansen T. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor Nrf2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* **285**(29), 22576–22591. doi: 10.1074/jbc.M110.118976
16. Lamark T., Svenning S., Johansen T. (2017) Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* **61**, 609–624. doi: 10.1042/EBC20170035
17. Taguchi K., Fujikawa N., Komatsu M., Ishii T., Unno M., Akaike T., Motohashi H., Yamamoto M. (2012) Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 13561–13566. doi: 10.1073/pnas.1121572109
18. Zhang D.D., Lo S.-C., Sun Z., Habib G.M., Lieberman M.W., Hannink M. (2005) Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 30091–30099. doi: 10.1074/jbc.M501279200
19. Duran A., Amanchy R., Linares J.F., Joshi J., Abu-Baker S., Porollo A., Hansen M., Moscat J., Diaz-Meco M.T. (2011) p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol. Cell.* **44**(1), 134–146. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.038
20. Switon K., Kotulska K., Janusz-Kaminska A., Zmorzynska J., Jaworski J. (2017) Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*. **341**, 112–153. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.017
21. Murugan A.K. (2019) mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **59**, 92–111. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.003
22. Kim J., Cha Y.-N., Surh Y.-J. (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res.* **690**(1–2), 12–23. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.007

23. Pickering A.M., Linder R.A., Zhang H., Forman H.J., Davies K.J.A. (2012) Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$  regulator ARE required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **287**(13), 10021–10031. doi: 10.1074/jbc.M111.277145
24. Ghanim B.Y., Qinna N.A. (2022) Nrf2/ARE axis signalling in hepatocyte cellular death. *Mol. Biol. Rep.* **49**(5), 4039–4053. doi: 10.1007/s11033-022-07125-6
25. Johansen T., Lamark T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. **7**, 279–296. doi: 10.4161/auto.7.3.14487
26. Copple I.M., Lister A., Obeng A.D., Kitteringham N.R., Jenkins R.E., Layfield R., Foster B.J., Goldring C.E., Park B.K. (2010) Physical functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1–Nrf2 cell defense pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 16782–16788. doi: 10.1074/jbc.M109.096545
27. Katsuragi Y., Ichimura Y., Komatsu M. (2015) p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* **282**, 4672–4678.
28. Carroll B., Otten E.G., Manni D., Stefanatos R., Menzies F.M., Smith G.R., Jurk D., Kenneth N., Wilkinson S., Passos J.F., Attems J., Veal E.A., Teysou E., Seilhean D., Millicamps S., Eskelinen E.L., Bronowska A.K., Rubinsztein D.C., Sanz A., Korolchuk V.I. (2018) Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nat. Commun.* **9**, 256. doi: 10.1038/s41467-017-02746-z
29. Rogov V., Dotsch V., Johansen T., Kirkin V. (2014) Interactions between autophagy receptors and ubiquitin like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell.* **53**(2), 167–178. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014
30. Dokladny K., Zuhl M.N., Mandell M., Bhattacharya D., Schneider S., Deretic V., Moseley P.L. (2013) Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response autophagy. *J. Biol. Chem.* **288**(21), 14959–14972. doi: 10.1074/jbc.M113.462408
31. Krämer L., Groh C., Herrmann J.M. (2021) The proteasome: friend and foe of mitochondrial biogenesis. *FEBS Lett.* **595**(8), 1223–1238. doi: 10.1002/1873-3468.14010
32. Jin S.M., Lazarou M., Wang C., Kane L.A., Narendra D.P., Youle R.J. (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* **191**, 933–942. doi: 10.1083/jcb.201008084
33. Novak I. (2012) Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxid. Redox Signal.* **17**(5), 794–802. doi: 10.1089/ars.2011.4407
34. Sanz L., Sanchez P., Lallena M.-J., Diaz-Meco M.T., Moscat J. (1999) The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* **18**(11), 3044–3053. doi: 10.1093/emboj/18.11.3044
35. Choe J.Y., Jung H.Y., Park K.Y., Kim S.K. (2014) Enhanced p62 expression through impaired proteasomal degradation is involved in caspase-1 activation in monosodium urate crystal-induced interleukin-1 $\beta$  expression. *Rheumatology (Oxford)*. **53**(6), 1043–1053. doi: 10.1093/rheumatology/ket474
36. 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. doi: 10.1038/ncb2012
37. Yamada T., Dawson T.M., Yanagawa T., Iijima M., Sesaki H. (2019) SQSTM1/p62 promotes mitochondrial ubiquitination independently of PINK1 and PRKN/PARKIN in mitophagy. *Autophagy*. **15**, 2012–2018. doi: 10.1080/15548627.2019.1643185
38. Sulkshane P., Ram J., Thakur A., Reis N., Kleifeld O., Glickman M.H. (2021) Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia. *Redox Biol.* **45**, 102047. doi: 10.1016/j.redox.2021.102047
39. Chu C.T. (2019) Mechanisms of selective autophagy and mitophagy: implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **122**, 23–34. doi: 10.1016/j.nbd.2018.07.015
40. Pankiv S., Clausen T.H., Lamark T., Brech A., Bruun J.A., Outzen H., Øvervatn A., Bjørkøy G., Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**(33), 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200
41. Boyle K.B., Randow F. (2013) The role of “eat-me” signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**(3), 339–348. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.010
42. Korac J., Schaeffer V., Kovacevic I., Clement A.M., Jungblut B., Behl C., Terzic J., Dikic I. (2013) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J. Cell Sci.* **126**(Pt. 2), 580–592. doi: 10.1242/jcs.114926
43. Jo C., Gundemir S., Pritchard S., Jin Y.N., Rahman I., Johnson G.V. (2014) Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat. Commun.* **5**, 3496. doi: 10.1038/ncomms4496
44. Inomata M., Niida S., Shibata K., Into T. (2012) Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**(6), 963–979. doi: 10.1007/s00018-011-0819-y
45. Yang M., Wang L., Chen C., Guo X., Lin C., Huang W., Chen L. (2021) Genome-wide analysis of autophagy-related genes in *Medicago truncatula* highlights their roles in seed development and response to drought stress. *Sci. Rep.* **11**(1), 22933. doi: 10.1038/s41598-021-02239-6
46. Zhou J., Wang J., Cheng Y., Chi Y.J., Fan B., Yu J.Q., Chen Z. (2013) NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in

- plant stress responses. *PLoS Genet.* **9**(1), e1003196. doi: 10.1371/journal.pgen.1003196
47. Zientara-Rytter K., Sirko A. (2014) Significant role of PB1 and UBA domains in multimerization of Joka2, a selective autophagy cargo receptor from tobacco. *Front. Plant Sci.* **5**, 13. doi: 10.3389/fpls.2014.00013
  48. Long J., Garner T.P., Pandya M.J., Craven C.J., Chen P., Shaw B., Williamson M.P., Layfield R., Searle M.S. (2010) Dimerisation of the UBA domain of p62 inhibits ubiquitinbinding and regulates NF- $\kappa$ B signalling. *J. Mol. Biol.* **396**(1), 178–194. doi: 10.1016/j.jmb.2009.11.032
  49. Matsumoto G., Shimogori T., Hattori N., Nukina N. (2015) TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* **24**(15), 4429–4442. doi: 10.1093/hmg/ddv179
  50. Wurzer B., Zaffagnini G., Fracchiolla D., Turco E., Abert C., Romanov J., Martens S. (2015) Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife*. **4**, e08941. doi: 10.7554/eLife.08941
  51. Nagy P., Hegedus K., Pircs K., Varga A., Juhasz G. (2014) Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **588**(3), 408–413. doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.012
  52. Nagy P., Kárpáti M., Varga A., Pircs K., Venkei Z., Takáts S., Varga K., Erdi B., Hegedűs K., Juhász G. (2014) Atg17/FIP200 localizes to perilyosomal Ref(2)P aggregates and promotes autophagy by activation of Atg1 in *Drosophila*. *Autophagy*. **10**(3), 453–467. doi: 10.4161/auto.27442
  53. Hennig P., Fenini G., Di Filippo M., Karakaya T., Beer H.D. (2021) The pathways underlying the multiple roles of p62 in inflammation and cancer. *Biomedicines*. **9**(7), 707. doi: 10.3390/biomedicines9070707
  54. Panwar V., Singh A., Bhatt M., Tonk R.K., Azizov S., Raza A.S., Sengupta S., Kumar D., Garg M. (2023) Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**(1), 375. doi: 10.1038/s41392-023-01608-z
  55. Juhász G. (2012) Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy*. **8**(12), 1875–1876. doi: 10.4161/auto.21544
  56. Danieli A., Martens S. (2018) p62-mediated phase separation at the intersection of the ubiquitin-proteasome system autophagy. *J. Cell Sci.* **131**(19), jcs214304. doi: 10.1242/jcs.214304
  57. Pai Y.L., Lin Y.J., Peng W.H., Huang L.T., Chou H.Y., Wang C.H., Chien C.T., Chen G.C. (2023) The deubiquitinase Leon/USP5 interacts with Atg1/ULK1 and antagonizes autophagy. *Cell Death Dis.* **14**(8), 540. doi: 10.1038/s41419-023-06062-x
  58. Yan J., Seibenhener M.L., Calderilla-Barbosa L., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Jiang J., Wooten M.W., Wooten M.C. (2013) SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One*. **278**(9), e76016. doi: 10.1371/journal.pone.0076016
  59. Nihira K., Miki Y., Ono K., Suzuki T., Sasano H. (2014) An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells. *Cancer Sci.* **105**(5), 568–575. doi: 10.1111/cas.12396
  60. Pankiv S., Lamark T., Bruun J.A., Øvervatn A., Bjørkøy G., Johansen T. (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J. Biol. Chem.* **285**(8), 5941–5953. doi: 10.1074/jbc.M109.039925
  61. Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**(5), 285–298. doi: 10.1038/nrm.2017.7
  62. Shin Y., Brangwynne C.P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. **357**(6357), eaaf4382. doi: 10.1126/science.aaf4382
  63. Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S., Rybarska A., Hoeghe C., Gharakhani J., Jülicher F., Hyman A.A. (2009) Germline P granules ARE liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*. **324**, 1729–1732. doi: 10.1126/science.1172046
  64. Li P., Banjade S., Cheng H.C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth J.V., King D.S., Banani S.F., Russo P.S., Jiang Q.X., Nixon B.T., Rosen M.K. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*. **483**(7389), 336–340. doi: 10.1038/nature10879
  65. Park S., Han S., Choi I., Kim B., Park S.P., Joe E.H., Suh Y.H. (2016) Interplay between leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) and p62/SQSTM-1 in selective autophagy. *PLoS One*. **11**(9), e0163029. doi: 10.1371/journal.pone.0163029
  66. Kurusu R., Morishita H., Komatsu M. (2024) p62 bodies: cytosolic zoning by phase separation. *J. Biochem.* **175**(2), 141–146. doi: 10.1093/jb/mvad089
  67. Jiang T., Harder B., Rojo de la Vega M., Wong P.K., Chapman E., Zhang D.D. (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **88**(Pt. B), 199–204. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014
  68. Rhee S.G., Bae S.H. (2015) The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. *Free Radic. Biol. Med.* **88**(Pt. B), 205–211. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.007
  69. Ro S.H., Fay J., Cyuzuzo C.I., Jang Y., Lee N., Song H.S., Harris E.N. (2020) SESTRINS: emerging dynamic stress-sensors in metabolic and environmental health. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 603421. doi: 10.3389/fcell.2020.603421

70. Bae S.H., Sung S.H., Oh S. Y., Lim J.M., Lee S.K., Park Y.N., Lee H.E., Kang D., Rhee S.G. (2013) Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 prevent oxidative liver damage. *Cell Metab.* **17**(1), 73–84. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.002
71. Kovaleva I.E., Tokarchuk A.V., Zheltukhin A.O., Dalina A.A., Safronov G.G., Evstafieva A.G., Lyamzaev K.G., Chumakov P.M., Budanov A.V. (2020) Mitochondrial localization of Sesn2. *PLoS One.* **15**(4), e0226862. doi: 10.1371/journal.pone.0226862
72. Gong L., Wang Z., Wang Z., Zhang Z. (2021) Sestrin2 as a potential target for regulating metabolic-related diseases. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). **12**, 751020. doi: 10.3389/fendo.2021.751020
73. Fatima M.T., Hasan M., Abdelsalam S.S., Sivaraman S.K., El-Gamal H., Zahid M.A., Elrayess M.A., Korashy H.M., Zeidan A., Parry A.S., Agouni A. (2021) Sestrin2 suppression aggravates oxidative stress and apoptosis in endothelial cells subjected to pharmacologically induced endoplasmic reticulum stress. *Eur. J. Pharmacol.* **907**, 174247. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174247
74. Joo M.S., Kim W.D., Lee K.Y., Kim J.H., Koo J.H., Kim S.G. (2016) AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 1931–1942. doi: 10.1128/MCB.00118-16
75. Mo C., Wang L., Zhang J., Numazawa S., Tang H., Tang X., Han X., Li J., Yang M., Wang Z., Wei D., Xiao H. (2014) The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 574–588. doi: 10.1089/ars.2012.5116
76. Herzig S., Shaw R.J. (2018) AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 121–135. doi: 10.1038/nrm.2017.95
77. Morgunova G.V., Klebanov A.A. (2019) Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from cellular energetics to longevity. *Cell Biochem. Funct.* **37**(3), 169–176. doi: 10.1002/cbf.3384
78. Shackelford D.B., Shaw R.J. (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 563–575. doi: 10.1038/nrc2676
79. Li X., Tang X., Su J., Xu G., Zhao L., Qi Q. (2019) Involvement of E-cadherin/AMPK/mTOR axis in LKB1-induced sensitivity of non-small cell lung cancer to gambogic acid. *Biochem. Pharmacol.* **169**, 113635. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113635.72
80. O'Neill E.J., Sze N.S.K., MacPherson R.E.K., Tsiani E. (2024) Carnosic acid against lung cancer: induction of autophagy and activation of Sestrin-2/LKB1/AMPK signalling. *Int. J. Mol. Sci.* **25**(4), 1950. doi: 10.3390/ijms25041950
81. Kim M.J., Bae S.H., Ryu J.C., Kwon Y., Oh J.H., Kwon J., Moon J.S., Kim K., Miyawaki A., Lee M.G., Shin J., Kim Y.S., Kim C.H., Ryter S.W., Choi A.M., Rhee S.G., Ryu J.H., Yoon J.H. (2016) SESN2/Sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages. *Autophagy.* **12**(8), 1272–1291. doi: 10.1080/15548627.2016.1183081
82. Tomasovic A., Kurrle N., Surun D., Heidler J., Husnjak K., Poser I., Schnutgen F., Scheibe S., Seimetz M., Jaksch P., Hyman A., Weissmann N., von Melchner H. (2015) Sestrin 2 protein regulates platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (Pdgfr $\beta$ ) expression by modulating proteasomal and Nrf2 transcription factor functions. *J. Biol. Chem.* **290**(15), 9738–9752. doi: 10.1074/jbc.M114.632133
83. Eid A.A., Lee D.Y., Roman L.J., Khazim K., Gorin Y. (2013) Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression. *Mol. Cell. Biol.* **33**(17), 3439–3460. doi: 10.1128/MCB.00217-13
84. Ichimura Y., Waguri S., Sou Y.-S., Kageyama S., Hasegawa J., Ishimura R., Saito T., Yang Y., Kouno T., Fukutomi T., Hoshii T., Hirao A., Takagi K., Mizushima T., Motohashi H., Lee M.-S., Yoshimori T., Tanaka K., Yamamoto M., Komatsu M. (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell.* **51**(5), 618–631. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003
85. Hashimoto K., Simmons A.N., Kajino-Sakamoto R., Tsuji Y., Ninomiya-Tsuji J. (2016) TAK1 regulates the Nrf2 antioxidant system through modulating p62/SQSTM1. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 953–964. doi: 10.1089/ars.2016.6663
86. Ran D., Ma Y., Liu W., Luo T., Zheng J., Wang D., Song R., Zhao H., Zou H., Gu J., Yuan Y., Bian J., Liu Z. (2020) TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) mediates cadmium-induced autophagy in osteoblasts via the AMPK/mTORC1/ULK1 pathway. *Toxicology.* **442**, 152538. doi: 10.1016/j.tox.2020.152538
87. Duleh S., Wang X., Komirenko A., Margeta M. (2016) Activation of the Keap1/Nrf2 stress response pathway in autophagic vacuolar myopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**(1), 115. doi: 10.1186/s40478-016-0384-6
88. Yang Y., Willis T.L., Button R.W., Strang C.J., Fu Y., Wen X., Grayson P.R.C., Evans T., Siphthorpe R.J., Roberts S.L., Hu B., Zhang J., Lu B., Luo S. (2019) Cytoplasmic DAXX drives SQSTM1/p62 phase condensation to activate Nrf2-mediated stress response. *Nat. Commun.* **10**(1), 3759. doi: 10.1038/s41467-019-11671-2.19
89. Goode A., Rea S., Sultana M., Shaw B., Searle M.S., Layfield R. (2016) ALS-FTLD associated mutations of SQSTM1 impact on Keap1-Nrf2 signalling. *Mol. Cell. Neurosci.* **76**, 52–58. doi: 10.1016/j.mcn.2016.08.004
90. Rolland T., Taşan M., Charlotiaux B., Pevzner S.J., Zhong Q., Sahni N., Yi S., Lemmens I., Fontanillo C., Mosca R., Kamburov A., Ghiassian S.D., Yang X., Ghamsari L., Balcha D., Begg B.E., Braun P.,

- Brehme M., Broly M.P., Carvunis A.-R., Convery-Zupan D., Corominas R., Coulombe-Huntington J., Dann E., Dreze M., Dricot A., Fan C., Franzosa E., Gebreab F., Gutierrez B.J., Hardy M.F., Jin M., Kang S., Kiroos R., Lin G.N., Luck K., MacWilliams A., Menche J., Murray R.R., Palagi A., Poulin M.M., Rambout X., Rasla J., Reichert P., Romero V., Ruyssinck E., Sahalie J.M., Scholz A., Shah A.A., Sharma A., Shen Y., Spirohn K., Tam S., Tejada A.O., Trigg S.A., Twizere J.-C., Vega K., Walsh J., Cusick M.E., Xia Y., Barabási A. L., Iakouchcheva L.M., Aloy P., De Las Rivas J., Tavernier J., Calderwood M.A., Hill D.E., Hao T., Roth F.P., Vidal M. (2014) A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*. **159**, 1212–1226. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.050
91. Seth D., Hess D.T., Hausladen A., Wang L., Wang Y.-J., Stamler J.S. (2018) A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation. *Mol. Cell*. **69**, 451–464.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.025
  92. Bonnet L.V., Palandri A., Flores-Martin J.B., Halak M.E. (2024) Arginyltransferase 1 modulates p62-driven autophagy via mTORC1/AMPK signaling. *Cell Commun. Signal*. **22**(1), 87. doi: 10.1186/s12964-024-01499-9
  93. Ji C.H., Kwon Y.T. (2017) Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Mol. Cells*. **40**(7), 441–449. doi: 10.14348/molcells.2017.0115
  94. Lee S.J., Kim H.Y., Lee M.J., Kim S.B., Kwon Y.T., Ji C.H. (2023) Characterization and chemical modulation of p62/SQSTM1/Sequestosome-1 as an autophagic N-recognin. *Methods Enzymol*. **686**, 235–265. doi: 10.1016/bs.mie.2023.02.005
  95. Zhang Y., Mun S.R., Linares J.F., Ahn J., Towers C.G., Ji C.H., Fitzwalter B.E., Holden M.R., Mi W., Shi X., Moscat J., Thorburn A., Diaz-Meco M.T., Kwon Y.T., Kutateladze T.G. (2018) ZZ-dependent regulation of p62/SQSTM1 in autophagy. *Nat. Commun*. **9**(1), 4373. doi: 10.1038/s41467-018-06878-8
  96. Cha-Molstad H., Yu J.E., Feng Z., Lee S.H., Kim J.G., Yang P., Han B., Sung K.W., Yoo Y.D., Hwang J., McGuire T., Shim S.M., Song H.D., Ganipisetti S., Wang N., Jang J.M., Lee M.J., Kim S.J., Lee K.H., Hong J.T., Ciechanover A., Mook-Jung I., Kim K.P., Xie X.Q., Kwon Y.T., Kim B.Y. (2017) p62/SQSTM1/Sequestosome-1 is an N-recognin of the N-end rule pathway which modulates autophagosome biogenesis. *Nat. Commun*. **8**(1), 102. doi: 10.1038/s41467-017-00085-7
  97. Demishtein A., Fraiberg M., Berko D., Tirosh B., Elazar Z., Navon A. (2017) SQSTM1/p62-mediated autophagy compensates for loss of proteasome polyubiquitin recruiting capacity. *Autophagy*. **13**(10), 1697–1708. doi: 10.1080/15548627.2017.1356549
  98. Jung E.J., Sung K.W., Bae T.H., Kim H.Y., Choi H.R., Kim S.H., Jung C.H., Mun S.R., Son Y.S., Kim S., Suh Y.H., Kashina A., Park J.W., Kwon Y.T. (2023) The N-degron pathway mediates lipophagy: the chemical modulation of lipophagy in obesity and NAFLD. *Metabolism*. **146**, 155644. doi: 10.1016/j.metabol.2023.155644
  99. Yoon M.J., Choi B., Kim E.J., Ohk J., Yang C., Choi Y.G., Lee J., Kang C., Song H.K., Kim Y.K., Woo J.S., Cho Y., Choi E.J., Jung H., Kim C. (2021) UXT chaperone prevents proteotoxicity acting as an autophagy adaptor for p62-dependent aggrephagy. *Nat. Commun*. **12**(1), 1955. doi: 10.1038/s41467-021-22252-7
  100. Pan M., Yin Y., Hu T., Wang X., Jia T., Sun J., Wang Q., Meng W., Zhu J., Dai C., Hu H., Wang C. (2023) UXT attenuates the CGAS-STING1 signaling by targeting STING1 for autophagic degradation. *Autophagy*. **19**(2), 440–456. doi: 10.1080/15548627.2022.2076192
  101. Han P., Mo S., Wang Z., Xu J., Fu X., Tian Y. (2023) UXT at the crossroads of cell death, immunity and neurodegenerative diseases. *Front. Oncol*. **13**, 1179947. doi: 10.3389/fonc.2023.1179947
  102. Sun S., Tang Y., Lou X., Zhu L., Yang K., Zhang B., Shi H., Wang C. (2007) UXT is a novel and essential cofactor in the NF- $\kappa$ B transcriptional enhanceosome. *J. Cell Biol*. **178**(2), 231–244. doi: 10.1083/jcb.200611081
  103. Sarkar S., Rubinsztein D.C. (2008) Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol. Biosyst*. **4**(9), 895–901. doi: 10.1039/b804606a
  104. Mizunoe Y., Kobayashi M., Sudo Y., Watanabe S., Yasukawa H., Natori D., Hoshino A., Negishi A., Okita N., Komatsu M., Higami Y. (2018) Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Biol*. **15**, 115–124. doi: 10.1016/j.redox.2017.09.007
  105. Galati S., Boni C., Gerra M.C., Lazzaretti M., Buschini A. (2019) Autophagy: a player in response to oxidative stress and DNA damage. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2019**, 5692958. doi: 10.1155/2019/5692958
  106. Beese C.J., Brynjólfssdóttir S.H., Frankel L.B. (2020) Selective autophagy of the protein homeostasis machinery: ribophagy, proteaphagy and ER-phagy. *Front. Cell Dev. Biol*. **7**, 373. doi: 10.3389/fcell.2019.00373
  107. Kim J., Lee S., Kim H., Lee H., Seong K.M., Youn H., Youn B. (2021) Autophagic organelles in DNA damage response. *Front. Cell Dev. Biol*. **9**, 668735. doi: 10.3389/fcell.2021.668735
  108. Jadia P., Tomar D. (2020) Mitochondrial protein quality control mechanisms. *Genes (Basel)*. **11**(5), 563. doi: 10.3390/genes11050563
  109. Rödl S., Herrmann J.M. (2023) The role of the proteasome in mitochondrial protein quality control. *IUBMB Life*. **75**(10), 868–879. doi: 10.1002/iub.2734
  110. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and

- PGC-1 $\alpha$  signaling pathways. *Front. Genet.* **10**, 435. doi: 10.3389/fgene.2019.00435
111. Gureev A.P., Sadovnikova I.S., Starkov N.N., Starkov A.A., Popov V.N. (2020) p62-Nrf2-p62 mitophagy regulatory loop as a target for preventive therapy of neurodegenerative diseases. *Brain Sci.* **10**(11), 847. doi: 10.3390/brainsci10110847
  112. Шиловский Г.А., Ашапкин В.В. (2022) Транскрипционный фактор Nrf2 и митохондрии — друзья или противники в редокс-регуляции темпов старения. *Биохимия.* **87**(12), 1856–1867. doi: 10.31857/S0320972522120065
  113. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. (2021) Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1868**(8), 119041. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119041
  114. Lu C., Jiang Y., Xu W., Bao X. (2023) Sestrin2: multifaceted functions, molecular basis, and its implications in liver diseases. *Cell Death Dis.* **14**(2), 160. doi: 10.1038/s41419-023-05669-4
  115. Далина А.А., Ковалева И.Е., Буданов А.В. (2018) Сестрины — шлагбаумы на путях от стресса к старению и болезням. *Молекуляр. биология.* **52**(6), 948–962. doi: 10.1134/S0026898418060046
  116. Haidurov A., Budanov A.V. (2020) Sestrin family — the stem controlling healthy ageing. *Mech. Ageing Dev.* **192**, 111379. doi: 10.1016/j.mad.2020.111379
  117. Ma S., Attarwala I.Y., Xie X.Q. (2019) SQSTM1/p62: a potential target for neurodegenerative disease. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 2094–2114. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00516
  118. Ramesh Babu J., Lamar Seibenhener M., Peng J., Strom A.L., Kemppainen R., Cox N., Zhu H., Wooten M.C., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Wooten M.W. (2008) Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J. Neurochem.* **106**(1), 107–120. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05340.x
  119. Zheng X., Wang W., Liu R., Huang H., Zhang R., Sun L. (2012) Effect of p62 on tau hyperphosphorylation in a rat model of Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* **7**, 1304–1311. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.17.004
  120. Caccamo A., Ferreira E., Branca C., Oddo S. (2017) p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Mol. Psychiatry.* **22**, 865–873. doi: 10.1038/mp.2016.139
  121. Katsuragi Y., Ichimura Y., Komatsu M. (2016) Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr. Opin. Toxicol.* **1**, 54–61. doi: 10.1016/j.cotox.2016.09.005
  122. Saito T., Ichimura Y., Taguchi K., Suzuki T., Mizushima T., Takagi K., Hirose Y., Nagahashi M., Iso T., Fukutomi T., Iso T., Fukutomi T., Ohiishi M., Endo K., Uemura T., Nishito Y., Okuda S., Obata M., Kouno T., Imamura R., Tada Y., Obata R., Yasuda D., Takahashi K., Fujimura T., Pi J., Lee M.S., Ueno T., Ohe T., Mashino T., Wakai T., Kojima H., Okabe T., Nagano T., Motohashi H., Waguri S., Soga T., Yamamoto M., Tanaka K., Komatsu M. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat. Commun.* **7**, 12030. doi: 10.1038/ncomms12030
  123. Menegon S., Columbano A., Giordano S. (2016) The dual roles of Nrf2 in cancer. *Trends Mol. Med.* **22**, 578–593. doi: 10.1016/j.molmed.2016.05.002
  124. Ahmed S.M., Luo L., Namani A., Wang X.J., Tang X. (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 585–597. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005
  125. Hennig P., Di Filippo M., Bilsfeld G., Mellett M., Beer H.D. (2022) High p62 expression suppresses the NLRP1 inflammasome and increases stress resistance in cutaneous SCC cells. *Cell Death Dis.* **13**(12), 1077. doi: 10.1038/s41419-022-05530-0
  126. Jeong S.J., Zhang X., Rodriguez-Velez A., Evans T.D., Razani B. (2019) p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **31**(6), 458–471. doi: 10.1089/ars.2018.7649
  127. Davidson J.M., Chung R.S., Lee A. (2022) The converging roles of sequestosome-1/p62 in the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). *Neurobiol. Dis.* **166**, 105653. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105653
  128. Jiang B., Zhou X., Yang T., Wang L., Feng L., Wang Z., Xu J., Jing W., Wang T., Su H., Yang G., Zhang Z. (2023) The role of autophagy in cardiovascular disease: cross-interference of signaling pathways and underlying therapeutic targets. *Front. Cardiovasc. Med.* **10**, 1088575. doi: 10.3389/fcvm.2023.1088575
  129. Tan C.T., Soh N.J.H., Chang H.C., Yu V.C. (2023) p62/SQSTM1 in liver diseases: the usual suspect with multifarious identities. *FEBS J.* **290**(4), 892–912. doi: 10.1111/febs.16317
  130. Yang H., Ni H.M., Ding W.X. (2019) Emerging players in autophagy deficiency-induced liver injury and tumorigenesis. *Gene Exp.* **19**(3), 229–234. doi: 10.3727/105221619X15486875608177
  131. Yu M., Zhang H., Wang B., Zhang Y., Zheng X., Shao B., Zhuge Q., Jin K. (2021) Key signaling pathways in aging and potential interventions for healthy aging. *Cells.* **10**(3), 660. doi: 10.3390/cells10030660
  132. Si J., Liu B., Qi K., Chen X., Li D., Yang S., Ji E. (2023) Tanshinone IIA inhibited intermittent hypoxia induced neuronal injury through promoting autophagy via AMPK-mTOR signaling pathway. *J. Ethnopharmacol.* **315**, 116677. doi: 10.1016/j.jep.2023.116677

## **p62: Intersection of Antioxidant Defense and Autophagy Pathways**

**G. A. Shilovsky<sup>1, 2, \*</sup>**

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

<sup>2</sup>*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia*

*\*email: gregory\_sh@list.ru, gr\_gerontol@gmail.com*

Numerous regulatory cascades link the cell's response to oxidative stress and the mechanisms of maintaining homeostasis and cell viability. The review summarizes the molecular mechanisms of interaction of the autophagy protein p62 with cell defense systems, primarily through the NRF2/KEAP1/ARE pathway. Understanding the cross-regulation of antioxidant defense and autophagy pathways contributes to the search for promising molecular targets for the treatment of age-related diseases.

**Keywords:** p62, NRF2, autophagy, feedback loop, KEAP1, age-related diseases, sestrins

УДК 577.24

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ИНГИБИТОРА АТМ KU-60019 НА ОСОБЯХ ТРЕХ ВИДОВ *Drosophila* С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ

© 2024 г. Л. А. Коваль<sup>а</sup>, Н. В. Земская<sup>а</sup>, Н. Р. Пакшина<sup>а</sup>, М. В. Шапошников<sup>а</sup>,  
А. А. Москалев<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,  
Сыктывкар, 167982 Россия

\*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 09.05.2024 г.

Принята к публикации 13.05.2024 г.

Серин/треониновая протеинкиназа АТМ (ataxia-telangiectasia mutated) выполняет в клетке ряд функций, связанных с процессом старения — участвует в регуляции клеточного ответа на повреждение ДНК, а также фосфорилирует вакуолярную АТФазу, что ведет к деградации лизосом и клеточному старению. В данной работе геропротекторный потенциал KU-60019, селективного ингибитора АТМ, проанализирован на трех видах *Drosophila* с разной продолжительностью жизни. Показано, что KU-60019 увеличивает продолжительность жизни особей долгоживущего вида (*D. virilis*) и вида с умеренной продолжительностью жизни (*D. melanogaster*). Однако продолжительность жизни особей короткоживущего вида *D. kikkawai* сокращается после обработки KU-60019. При этом KU-60019 повышает выживаемость дрозофил трех видов в условиях гипертермии, окислительного стресса и голодания, но не оказывает влияния на возрастзависимое изменение уровня локомоторной активности. Подавление экспрессии гена *tefu*, кодирующего гомолог АТМ, с помощью РНК-интерференции также приводит к увеличению продолжительности жизни и стрессоустойчивости особей *D. melanogaster* по сравнению с мухами контрольных линий. Таким образом, влияние KU-60019 на продолжительность жизни варьирует в зависимости от вида *Drosophila*, что может быть связано с установленными нами ранее различиями транскриптомов у исследуемых видов и требует дальнейшего экспериментального изучения.

**Ключевые слова:** ингибитор АТМ, KU-60019, продолжительность жизни, стрессоустойчивость, спонтанная двигательная активность, *Drosophila*

DOI: 10.31857/S0026898424050042, EDN: HURGGP

### ВВЕДЕНИЕ

Белок АТМ (ataxia-telangiectasia mutated) представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, высококонсервативную у эукариот [1]. АТМ локализуется преимущественно в ядре и быстро активируется при повреждениях ДНК сигнальным комплексом Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) или независимо от комплекса MRN в ответ на окислительный стресс [2]. АТМ фосфорилирует более 700 мишеней, включая белки, участвующие в репарации повреждений ДНК, регуляции биогенеза микронуклеуса, контроле клеточного цикла и апоптозе [3–6].

Мутация в гене *ATM* у человека может приводить к развитию атаксии-телеангиэктазии — редкого генетического заболевания,

известного также, как синдром Луи-Бара, которое характеризуется повышенной чувствительностью к ионизирующему излучению, нейродегенерацией, иммунодефицитом, предрасположенностью к раку, метаболическими нарушениями и преждевременным старением — большинство таких пациентов умирают в возрасте 20–30 лет [7, 8]. Сходный спектр нарушений отмечен также у мышей с дефицитом АТМ [9], крыс [10], рыб *Danio rerio* [11] и дрозофил с мутацией *ATM* [12–14]. Вместе с тем, описаны однонуклеотидные полиморфизмы гена *ATM*, ассоциированные с долгожительством у человека [15–17].

Кроме того, АТМ выполняет ряд функций, которые не имеют прямой связи с ответом на

повреждение ДНК, но связаны с процессом старения, включая клеточный ответ на окислительный стресс [18], метаболизм глюкозы [19], гомеостаз митохондрий [20], костный метаболизм [21], иммунный ответ [22], аутофагию [23, 24], воспаление [10, 25], поддержание теломер [14, 26], регуляцию активности лизосом [27].

В недавних исследованиях Kang и соавт. [27] и Kik и соавт. [28] показано, что подавление активности АТМ может иметь геропротекторный потенциал. Так, при клеточном старении вакуолярная АТРаза (V-АТРаза), участвующая в регуляции активности лизосом, фосфорилируется киназой АТМ, что ведет к нарушению функции лизосом, снижению аутофагии и последующему накоплению дисфункциональных митохондрий с избыточной продукцией активных форм кислорода [27]. Подавление активности АТМ селективным ингибитором KU-60019 в спонтанно и ускоренно стареющих клетках вызывает снижение фосфорилирования V-АТРазы, восстанавливает активность лизосом и активирует процесс аутофагии, тем самым способствует удалению дисфункциональных митохондрий [27, 28].

Таким образом, можно заключить, что протеинкиназа АТМ имеет большое количество связанных с клеточным старением мишеней фосфорилирования и вовлечена в регуляцию продолжительности жизни организма. При этом геропротекторный потенциал ингибиторов АТМ слабо изучен.

У *Drosophila melanogaster* описаны два белка ответа на повреждение, которые входят в семейство киназ АТМ: meiotic 41 (mei-41), гомологичный АТР [29, 30] и telomere fusion (tefu), который имеет гомологию с АТМ человека [30–32]. Наличие данных белков позволяет использовать муху в качестве модели при оценке геропротекторного потенциала свойств ингибирования АТМ.

В настоящей работе мы проанализировали геропротекторный потенциал специфического ингибитора киназы АТМ — KU-60019, используя в качестве модели особи трех видов дрозофил: *D. melanogaster*, *D. kikkawai* и *D. virilis* с различной продолжительностью жизни, а также *D. melanogaster* с опосредованным РНК-интерференцией нокдауном гена *tefu*. Проанализированы изменения в продолжительности жизни, стрессоустойчивости и спонтанной активности мух.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Линии *Drosophila*.** Короткоживущая линия вида *D. kikkawai* и долгоживущая линия вида *D. virilis* предоставлены В. Гладышевым (Гарвард, США). Линии *D. melanogaster* получены из кол-

лекции дрозофил “Bloomington *Drosophila* Stock Center” Университета Индианы США. В качестве линии с умеренной продолжительностью жизни использовали линию дикого типа  *Canton-S* (#64349, далее обозначена как *CS*) *D. melanogaster*. В качестве драйверной линии использовали *da-GAL4* (#55849), которая экспрессирует активатор транскрипции GAL4 во всех клетках организма, а в качестве активируемой линии — линию *UAS-RNAi-tefu* (#31635), которая экспрессирует дцРНК под контролем GAL4-активируемого промотора UAS для подавления экспрессии гена *tefu*.

**Подавление экспрессии гена *tefu*.** Для нокдауна гена *tefu* (гомолог АТМ [30]) виргинных самок линии *UAS-RNAi-tefu* скрещивали с самцами линии *da-GAL4*. Полученные потомки F<sub>1</sub> с генотипом *da-GAL4 > RNAi-tefu* характеризовались сайленсингом гена *tefu*, опосредованным интерференцией РНК (RNAi). Подавление экспрессии *tefu* происходило во всех клетках организма на протяжении всего жизненного цикла. Эффективность и специфичность используемого РНК-интерференционного реагента (*P{TRiP.JF01422}attP2*) подтверждена данными, представленными в базе данных FlyRNAi [33].

**Условия содержания дрозофил.** Для культивирования дрозофил и постановки экспериментов использовали климатические камеры Binder KBF720-ICH (“Binder”, Германия). Мух содержали при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 60% и 12 ч режиме освещения. Использовали питательную среду следующего состава: вода — 1 л, кукурузная мука — 92 г, сухие дрожжи — 32.1 г, агар-агар — 5.2 г, глюкоза — 136.9 г. Пропионовую кислоту — 5 мл и нипагин — 10 мл 10%-ного раствора в 95%-ном этаноле добавляли для снижения микробной нагрузки. Данная питательная среда, как показано ранее, не снижает показатели репродукции *D. melanogaster* и не влияет на продолжительность жизни в ряду поколений [34]. Ряд исследований, проведенных в нашей лаборатории, также подтвердил оптимальность этой среды для экспериментального изучения продолжительности жизни у *D. melanogaster* [35, 36]. Сходство компонентного состава данной питательной среды и среды, используемой при поддержании коллекции видов дрозофил в Корнельском университете (“National *Drosophila* Species Stock Center”, США) позволило предположить, что она пригодна для оценки продолжительности жизни у всех трех видов *Drosophila*.

**Обработка ингибитором АТМ.** На поверхность питательной среды наносили 30 мкл раствора KU-60019 (#531978, “Sigma-Aldrich”, США) в 96%-ном этиловом спирте в концентрации 1

и 100 мкмоль/л (мкМ). На среду контрольной группы животных наносили 30 мкл 96%-ого этилового спирта. Концентрация ингибитора АТМ 1 мкМ была выбрана на основании экспериментальных данных, полученных на культуре клеток [28]. Использовали также увеличенную на два порядка концентрацию — 100 мкМ. Экспериментальные особи получали KU-60019 в составе питательной среды 2 раза в неделю в течение всей жизни.

**Анализ продолжительности жизни.** Контрольные и экспериментальные особи были собраны в течение 24 ч после вылупления имаго. С использованием углекислотного наркоза мух сортировали по полу и рассаживали в пробирки размером 25 мм × 95 мм “Narrow *Drosophila* Vials” (# 32–109, “Genesee Scientific”, США) по 30 особей. Мух переносили на свежую среду 2 раза в неделю. Число умерших особей подсчитывали ежедневно, начиная с первого дня жизни имаго. На основании полученных данных рассчитывали медианную (50-й перцентиль) и максимальную (90-й перцентиль) продолжительность жизни (ПЖ) и строили кривые выживаемости. В каждом варианте анализировали по 150 особей. Каждый эксперимент повторяли 2–3 раза.

**Анализ стрессоустойчивости.** Оценивали устойчивость к гипертермии (35°C), окислительному стрессу и голоданию. Мух содержали на среде, содержащей 2% агар-агара и 5% сахарозы. В случае анализа устойчивости мух к окислительному стрессу в среду добавляли 20 ммоль/л (мМ) параквата (#856177, “Sigma-Aldrich”, США). При оценке устойчивости к голоданию сахарозу в питательную среду не добавляли. В возрасте 14 сут исследуемые мухи подвергались воздействию факторов стресса. Мы исходили из предположения, что 14 дней обработки ингибитором достаточно для того, чтобы вещество повлияло на активность АТМ, тогда как еще не наблюдался эффект возрастного снижения стрессоустойчивости. Гибель мух в описанных условиях стресса оценивали с использованием монитора активности DAM2 (*Drosophila* Activity Monitor, “Trikinetics”, США). Мух рассаживали по одной особи в стеклянный капилляр (диаметр 5 мм, длина 60 мм) для записи активности. Время гибели мух определяли по полному прекращению двигательной активности. На основании полученных данных было рассчитано медианное время выживаемости в часах (50-й перцентиль) и построенные кривые выживаемости. В каждом варианте анализировали по 32 самца и 32 самки. Каждый эксперимент повторяли 2–3 раза.

**Анализ спонтанной локомоторной активности.** Оценку активности проводили 1 раз в неделю у мух в возрасте от 1 до 10 недель. В каждом

варианте эксперимента использовали четыре–пять пробирок по 10 мух в каждой. Использовали узкие пробирки улучшенной прозрачности “*Drosophila* Vials, Narrow (KR)” (#32–118, “Genesee Scientific”, США). Анализ проводили в мониторах активности LAM25 (Locomotor Activity Monitor, “TriKinetics”, США). При проведении теста пробирки находились в горизонтальном положении. Данные (количество срабатываний датчиков движения) с прибора записывали в течение 24 ч и представляли в виде средней суточной активности на одну особь.

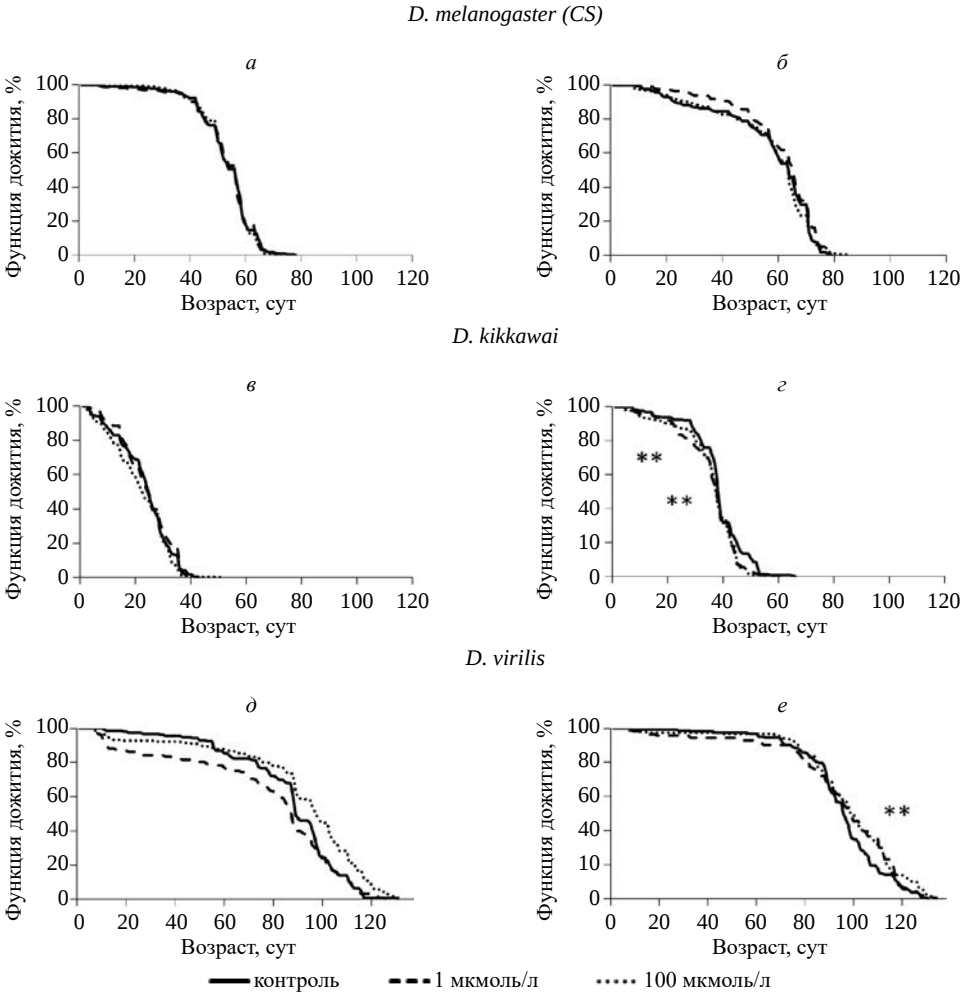
**Статистический анализ результатов.** Достоверность различий между кривыми дожития оценивали с использованием логрангового критерия (критерий Мантеля–Кокса) [37], критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона [38]. Статистическую значимость отличий во времени гибели по перцентильям оценивали с использованием точного критерия Фишера и теста Ванг–Аллисона (тест Бошлу) [39]. В случае множественного сравнения при расчете уровня значимости различий применяли поправку Бонферрони [40]. Статистическую значимость различий в спонтанной активности оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и пост-хок тест Тьюки [41]. Статистические данные анализировали с помощью программы Statistica, версия 13 (“TIBCO Software Inc.”, США), статистической среды R, версия 2.15.1 (The R Foundation) и онлайн приложения OASIS 2 [42].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Влияние KU-60019 на продолжительность жизни Drosophila*

Изучали влияние KU-60019 в концентрациях 1 и 100 мкМ на ПЖ представителей трех видов рода *Drosophila* с разной ПЖ — *D. melanogaster* с умеренной ПЖ (рис. 1а,б, табл. 1), короткоживущего вида *D. kikkawai* (рис. 1в,г, табл. 1) и долгоживущего вида *D. virilis* (рис. 1д,е, табл. 1).

Наблюдали увеличение медианной ПЖ у самок *D. melanogaster* (линия CS) на 3% при концентрации KU-60019 1 мкМ ( $p < 0.05$ ), а также у самцов и самок *D. virilis* на 10 и 3%, соответственно, при концентрации KU-60019 100 мкМ ( $p < 0.0001$  и  $p < 0.05$ ). Кроме того, показано увеличение показателя максимальной ПЖ самцов и самок *D. virilis* на 7% при концентрации KU-60019 100 мкМ ( $p < 0.01$ ). Медианная ПЖ снижалась у самок *D. kikkawai* на 3% ( $p < 0.001$ ) в присутствии 1 и 100 мкМ KU-60019 (рис. 1, табл. 1). Максимальная ПЖ снижалась у самцов и самок *D. kikkawai* на 8% при концентрации исследуемого вещества 100 мкМ ( $p < 0.01$ ) и на



**Рис. 1.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 в концентрациях 1 и 100 мкМ на продолжительность жизни самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) рода *Drosophila*: *D. melanogaster* (CS), *D. kikkawai*, *D. virilis*. \*\* –  $p < 0.001$ , логранговый критерий с поправкой Бонферрони.

**Таблица 1.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 на продолжительность жизни видов рода *Drosophila*

| Вид <i>Drosophila</i>       | KU-60019, мкМ | Пол | М, сут | dM, % | МК      | ГВ    | 90% (сут) | d90% (%) | ВА      | N   |
|-----------------------------|---------------|-----|--------|-------|---------|-------|-----------|----------|---------|-----|
| <i>D. melanogaster</i> (CS) | контроль      | ♂   | 57     | n/a   | n/a     | n/a   | 65        | n/a      | n/a     | 285 |
|                             | 1             | ♂   | 57     | 0     | >0.05   | >0.05 | 64        | –2       | >0.05   | 285 |
|                             | 100           | ♂   | 57     | 0     | >0.05   | >0.05 | 64        | –2       | >0.05   | 295 |
| <i>D. kikkawai</i>          | контроль      | ♂   | 25     | n/a   | n/a     | n/a   | 36        | n/a      | n/a     | 312 |
|                             | 1             | ♂   | 25     | 0     | >0.05   | >0.05 | 36        | 0        | >0.05   | 279 |
|                             | 100           | ♂   | 23     | –8    | >0.05   | >0.05 | 33        | –8       | <0.01   | 319 |
| <i>D. virilis</i>           | контроль      | ♂   | 89     | n/a   | n/a     | n/a   | 112       | n/a      | n/a     | 158 |
|                             | 1             | ♂   | 88     | –1    | >0.05   | <0.05 | 112       | 0        | >0.05   | 158 |
|                             | 100           | ♂   | 98     | +10   | <0.0001 | <0.01 | 120       | +7       | <0.0001 | 165 |
| <i>D. melanogaster</i> (CS) | контроль      | ♀   | 64     | n/a   | n/a     | n/a   | 72        | n/a      | n/a     | 298 |
|                             | 1             | ♀   | 66     | +3    | <0.05   | <0.05 | 74        | +3       | >0.05   | 277 |
|                             | 100           | ♀   | 64     | 0     | >0.05   | >0.05 | 72        | 0        | >0.05   | 282 |
| <i>D. kikkawai</i>          | контроль      | ♀   | 39     | n/a   | n/a     | n/a   | 51        | n/a      | n/a     | 283 |
|                             | 1             | ♀   | 38     | –3    | <0.001  | <0.01 | 45        | –12      | <0.001  | 309 |
|                             | 100           | ♀   | 38     | –3    | <0.001  | <0.01 | 45        | –12      | <0.0001 | 308 |

Таблица 1. Окончание

| Вид <i>Drosophila</i> | KU-60019, мкМ | Пол | М, сут | dM, % | МК    | ГВ    | 90% (сут) | d90% (%) | ВА      | N   |
|-----------------------|---------------|-----|--------|-------|-------|-------|-----------|----------|---------|-----|
| <i>D. virilis</i>     | контроль      | ♀   | 96     | n/a   | n/a   | n/a   | 118       | n/a      | n/a     | 163 |
|                       | 1             | ♀   | 99     | +3    | >0.05 | >0.05 | 118       | 0        | >0.05   | 142 |
|                       | 100           | ♀   | 99     | +3    | <0.05 | >0.05 | 126       | +7       | <0.0001 | 157 |

Примечание. ♂ – самцы, ♀ – самки, М – медианная продолжительность жизни (сут), 90% – возраст 90% смертности (сут), dM и d90% – различия медианной продолжительности жизни и возраста 90% смертности между контрольными и экспериментальными линиями соответственно (%), ГВ – значение  $p$  по критерию Гехана–Вилкоксона, МК – значение  $p$  по критерию Мантеля–Кокса, ВА – значение  $p$  по тесту Ванг–Аллисона, n/a – неприменимо, N – количество особей в выборке.

12% – при 1 и 100 мкМ ( $p < 0.001$ ). Полученные данные подтверждаются статистически значимым ( $p < 0.001$ ) сдвигом кривых дожития влево у самок *D. kikkawai* при обеих изученных концентрациях и вправо у самок *D. virilis* при 100 мкМ KU-60019 (рис. 1з,е).

Таким образом, геропротекторный эффект KU-60019 выявлен у самцов и самок долгоживущего вида *D. virilis* и самок *D. melanogaster* с умеренной ПЖ. Напротив, у особей короткоживущего вида *D. kikkawai* отмечено снижение ПЖ после обработки KU-60019.

#### Влияние KU-60019 на стрессоустойчивость дрозофил

Исследовано влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на выживаемость особей *D. melanogaster* (рис. 2, табл. 2), *D. kikkawai* (рис. 3, табл. 3) и *D. virilis* (рис. 4, табл. 4) в условиях гипертермии (35°C), окислительного стресса (паракват 20 мМ) и голодания (2%-ная агаровая среда без добавления сахарозы).

Показано, что обработка самцов и самок *D. melanogaster* KU-60019 приводит к статистически значимому ( $p < 0.001$ ) увеличению устойчивости к гипертермии (рис. 2а,б, табл. 2). Медианное время выживаемости при этом увеличивается на 13% у самцов после обработки KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ и на 7% у самок после обработки KU-60019 в концентрации 100 мкМ. Статистически значимых эффектов KU-60019 на выживаемость особей *D. melanogaster* в условиях окислительного стресса не отмечено (рис. 2в,г, табл. 2). Также у самцов *D. melanogaster* после обработки KU-60019 в концентрации 100 мкМ наблюдается повышение устойчивости к голоданию – медианное время выживаемости увеличивается на 17% (рис. 2д,е, табл. 2).

У особей *D. kikkawai* обработка KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ вызывает снижение медианного времени устойчивости к гипертермии у самцов на 47 и 33%, соответ-

ственно, и его повышение у самок на 189 и 200% соответственно (рис. 3а,б, табл. 3). Медианное время выживаемости в условиях окислительного стресса повышается как у самцов (на 36% после обработки 100 мкМ KU-60019), так и у самок – на 28 и 16% после обработки 1 и 100 мкМ KU-60019 соответственно (рис. 3в,г, табл. 3). У самок *D. kikkawai* обработка KU-60019 в концентрации 100 мкМ вызывает снижение медианной устойчивости к голоданию на 14% (рис. 2д,е, табл. 2).

Показано, что предварительная обработка *D. virilis* KU-60019 в условиях гипертермии вызывает увеличение медианного времени выживаемости: у самцов – на 38% (100 мкМ KU-60019) и у самок – на 27 и 38% (1 и 100 мкМ KU-60019) соответственно (рис. 4а,б, табл. 4). Обработка самцов *D. virilis* KU-60019 в концентрации 100 мкМ приводит к увеличению медианного времени выживаемости в условиях окислительного стресса на 41% (рис. 4в,г, табл. 4). В то же время обнаружено снижение медианного времени выживаемости самок *D. virilis* в условиях голодания на 17 и 25% после обработки KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ соответственно (рис. 4д,е, табл. 4).

Таким образом, влияние KU-60019 на выживаемость особей рода *Drosophila* в условиях гипертермии, окислительного стресса и голодания зависит от концентрации соединения, вида и пола мух.

#### Влияние KU-60019 на спонтанную двигательную активность *Drosophila*

Изучено влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на возрастные изменения уровня спонтанной активности особей трех видов рода *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. kikkawai* и *D. virilis*.

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически значимое влияние возраста ( $p < 0.0001$ ), но не обработки KU-60019, на спонтанную двигательную актив-

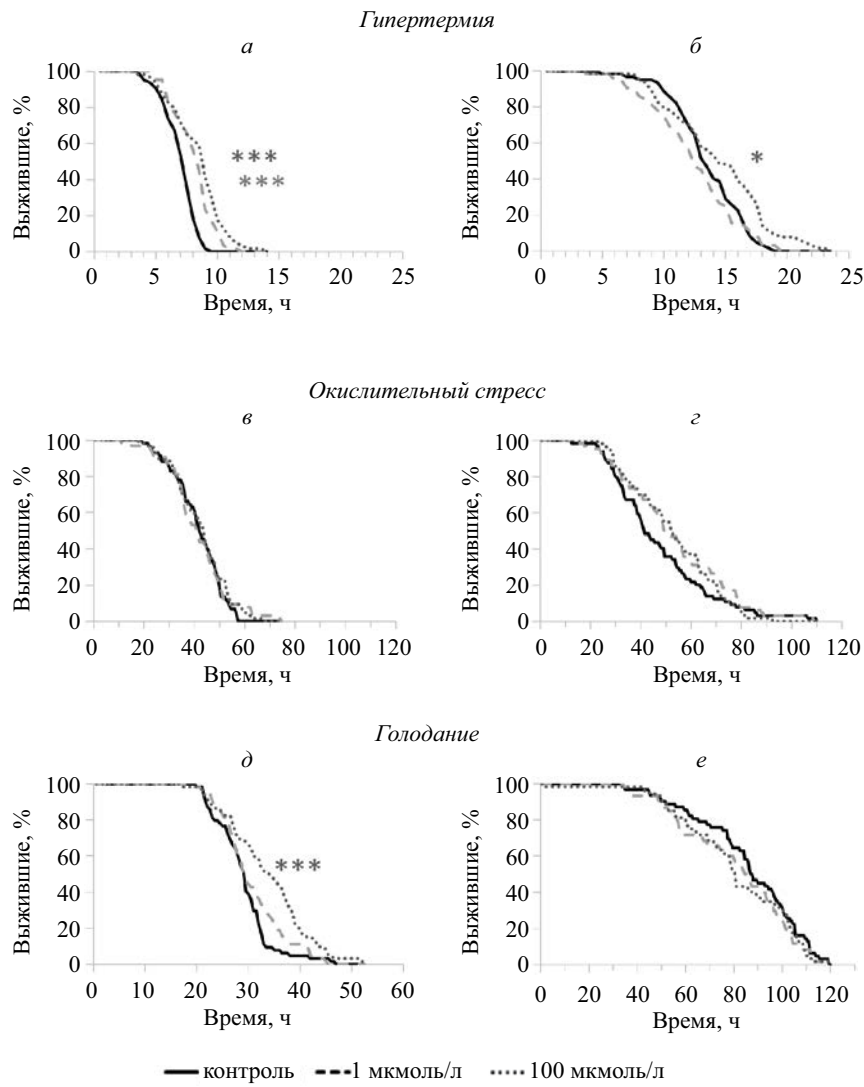


Рис. 2. Влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на стрессоустойчивость самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) *D. melanogaster*. \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ , логранговый критерий с поправкой Бонферрони.

Таблица 2. Влияние ингибитора АТМ KU-60019 на стрессоустойчивость особей *D. melanogaster*

| Вариант              | Пол | М, ч | dM, % | ВА     | Ф      | ЛР     | N  |
|----------------------|-----|------|-------|--------|--------|--------|----|
| Гипертермия          |     |      |       |        |        |        |    |
| Контроль             | ♂   | 8    | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 64 |
| 1 мкМ KU60019        | ♂   | 9    | +13   | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 64 |
| 100 мкМ KU60019      | ♂   | 9    | +13   | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 63 |
| Контроль             | ♀   | 14   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 62 |
| 1 мкМ KU60019        | ♀   | 13   | –7    | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 64 |
| 100 мкМ KU60019      | ♀   | 15   | +7    | >0.05  | >0.05  | <0.05  | 64 |
| Окислительный стресс |     |      |       |        |        |        |    |
| Контроль             | ♂   | 42   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 59 |
| 1 мкМ KU60019        | ♂   | 41   | –2    | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 64 |
| 100 мкМ KU60019      | ♂   | 44   | +5    | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 64 |
| контроль             | ♀   | 42   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 64 |
| 1 мкМ KU60019        | ♀   | 50   | +19   | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 64 |
| 100 мкМ KU60019      | ♀   | 52   | +24   | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 56 |

Таблица 2. Окончание

| Вариант          | Пол | М, ч | dM, % | ВА     | Ф     | ЛР     | N  |
|------------------|-----|------|-------|--------|-------|--------|----|
| <i>Голодание</i> |     |      |       |        |       |        |    |
| Контроль         | ♂   | 30   | n/a   | n/a    | n/a   | n/a    | 64 |
| 1 мкМ KU60019    | ♂   | 30   | 0     | >0.05  | >0.05 | >0.05  | 63 |
| 100 мкМ KU60019  | ♂   | 35   | +17   | <0.001 | <0.01 | <0.001 | 62 |
| Контроль         | ♀   | 88   | n/a   | n/a    | n/a   | n/a    | 62 |
| 1 мкМ KU60019    | ♀   | 85   | –3    | >0.05  | >0.05 | >0.05  | 60 |
| 100 мкМ KU60019  | ♀   | 81   | –8    | >0.05  | >0.05 | >0.05  | 60 |

Примечания. Здесь и в табл. 3–4. ♂ – самцы, ♀ – самки, М – время медианной выживаемости (ч), 90% – возраст 90% смертности (сут), dM – различия медианной выживаемости между контрольными и экспериментальными мухами (%), ВА – значение  $p$  по тесту Ванг–Аллисона, Ф – значение  $p$  по точному критерию Фишера, n/a – неприменимо, ЛР – значение  $p$  по логранговому критерию, N – количество особей в выборке.

ность самцов и самок *D. melanogaster* (рис. 5а,б, табл. 5). Пост-хок тест Тьюки показал статистически значимое снижение активности с возрастом в экспериментальных группах самцов ( $p < 0.05$ ) и самок ( $p < 0.01$ ), а также в контрольных группах самок ( $p < 0.05$ ), но не самцов.

У *D. kikkawai* с помощью ANOVA показан статистически значимый вклад возраста ( $p < 0.001$ ) в спонтанную двигательную активность самцов и самок, при этом эффект KU-60019 ( $p < 0.001$ ) выявлен только у самцов (рис. 5в,г, табл. 5). Попарное сравнение вариантов с помощью пост-хок теста Тьюки выявило статистически значимое увеличение локомоторной активности у самцов ( $p < 0.001$ ) и самок ( $p < 0.001$ ) с возрастом, но не показало эффектов обработки KU-60019 у самцов ( $p > 0.05$ ).

ANOVA выявил вклад возраста в спонтанную двигательную активность ( $p < 0.0001$ ) самцов и самок *D. virilis*, тогда как влияние KU-60019 ( $p < 0.01$ ) показано только у самок (рис. 5д,е, табл. 5). Пост-хок тест Тьюки показал статистически значимое возрастное снижение спонтанной двигательной активности у самцов, обработанных 1 мкМ KU-60019, а также у самок старше 3–4 недель, контрольных и обработанных 1 и 100 мкМ KU-60019. Отмечено также снижение двигательной активности у трехнедельных самок, получавших KU-60019 в концентрации 100 мкМ ( $p < 0.05$ ).

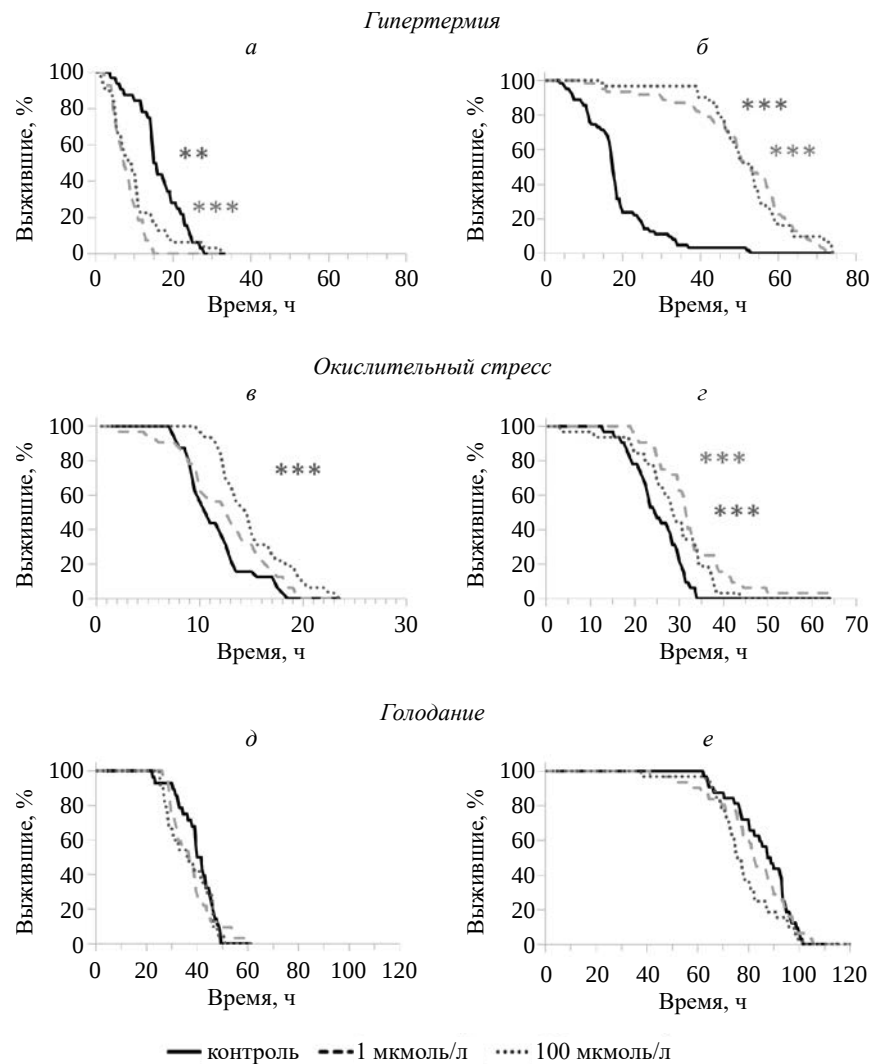
Таким образом, обработка KU-60019 не оказывает существенного влияния на возрастные изменения локомоторной активности у особей трех видов *Drosophila*.

#### Влияние РНК-интерференции гена *tefu* на эффекты KU-60019

Продукт гена *tefu*, являющийся гомологом АТМ млекопитающих [30], верифицировали

в качестве мишени KU-60019 путем анализа эффектов ингибитора АТМ на продолжительность жизни линии мух, в которой экспрессия гена *tefu* подавлена с помощью РНК-интерференции. Нами установлено, что опосредованное РНК подавление экспрессии гена *tefu* приводит к увеличению медианной продолжительности жизни на 51 и 23% у самцов, на 87 и 12% у самок и максимальной продолжительности жизни на 27 и 22% у самцов, 40 и 13% у самок по сравнению с особями контрольных родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu* соответственно (табл. 6).

В подтверждение *tefu*-опосредованного действия KU-60019 у самцов *da-GAL4 > RNAi-tefu* геропротекторный эффект этого вещества был выражен слабее, чем у контрольных самцов *UAS-RNAi-tefu*, что проявляется отсутствием статистически значимого эффекта на медианную продолжительность жизни и меньшим сдвигом вправо кривых дожития (рис. 6а,д, табл. 6). При этом положительный эффект KU-60019 (1 и 100 мкМ) на максимальную продолжительность жизни самцов сохраняется как у контрольных *UAS-RNAi-tefu*, так и у экспериментальных *da-GAL4 > RNAi-tefu* вариантов (табл. 6). Необходимо отметить, что обработка контрольных самцов *da-GAL4* KU-60019 в обеих концентрациях приводит к снижению максимальной продолжительности жизни (рис. 6в, табл. 6), что может быть связано с биологическими особенностями данной линии и низкой жизнеспособностью. Статистически значимое влияние KU-60019 на показатели продолжительности жизни и кривые смертности экспериментальных *da-GAL4 > RNAi-tefu* и контрольных самок *UAS-RNAi-tefu* наблюдалось только при концентрации 100 мкМ (рис. 6б,г,е, табл. 6). При этом медианная продолжительность жизни у самок *da-GAL4 > RNAi-tefu* увеличивалась на 4% и снижалась на 5% у контрольных самок *UAS-RNAi-tefu*.



**Рис. 3.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на стрессоустойчивость самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) *D. kikkawai*. элементов: \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ , логранговый критерий с поправкой Бонферрони.

**Таблица 3.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 на стрессоустойчивость особей *D. kikkawai*

| Вариант              | Пол | М, ч | dM, % | ВА     | Ф      | ЛР     | N  |
|----------------------|-----|------|-------|--------|--------|--------|----|
| Гипертермия          |     |      |       |        |        |        |    |
| Контроль             | ♂   | 15   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 32 |
| 1 мкМ KU60019        | ♂   | 8    | –47   | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 27 |
| 100 мкМ KU60019      | ♂   | 10   | –33   | <0.001 | <0.001 | <0.01  | 31 |
| Контроль             | ♀   | 18   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 63 |
| 1 мкМ KU60019        | ♀   | 52   | +189  | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 62 |
| 100 мкМ KU60019      | ♀   | 54   | +200  | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 31 |
| Окислительный стресс |     |      |       |        |        |        |    |
| Контроль             | ♂   | 11   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 32 |
| 1 мкМ KU60019        | ♂   | 13   | +18   | >0.05  | >0.05  | >0.05  | 32 |
| 100 мкМ KU60019      | ♂   | 15   | +36   | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 32 |
| Контроль             | ♀   | 25   | n/a   | n/a    | n/a    | n/a    | 32 |
| 1 мкМ KU60019        | ♀   | 32   | +28   | <0.01  | <0.01  | <0.001 | 32 |
| 100 мкМ KU60019      | ♀   | 29   | +16   | >0.05  | >0.05  | <0.01  | 32 |

Таблица 3. Окончание

| Вариант         | Пол | М, ч | dM, % | ВА    | Ф     | ЛР    | N  |
|-----------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|----|
| Голодание       |     |      |       |       |       |       |    |
| Контроль        | ♂   | 40   | n/a   | n/a   | n/a   | n/a   | 28 |
| 1 мкМ KU60019   | ♂   | 37   | –8    | >0.05 | >0.05 | >0.05 | 32 |
| 100 мкМ KU60019 | ♂   | 36   | –10   | >0.05 | >0.05 | >0.05 | 24 |
| Контроль        | ♀   | 88   | n/a   | n/a   | n/a   | n/a   | 32 |
| 1 мкМ KU60019   | ♀   | 83   | –6    | >0.05 | >0.05 | >0.05 | 31 |
| 100 мкМ KU60019 | ♀   | 76   | –14   | <0.05 | <0.05 | >0.05 | 32 |

Таким образом, подавление экспрессии гена *tefu* вызывает увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни у особей *da-GAL4 > RNAi-tefu* по сравнению с мухами контрольных родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu*. При этом обработка KU-60019 в меньшей степени затрагивает показатели продолжительности жизни и кривые смертности экспериментальных линий с РНК-интерференцией гена *tefu* по сравнению с контрольными линиями.

Изучено также влияние обработки 1 и 100 мкМ KU-60019 в сочетании с РНК-интерференцией гена *tefu* на стрессоустойчивость особей *D. melanogaster*. Обработка ингибитором АТМ привела к значительному увеличению выживаемости в условиях гипертермии (35°C) особей *da-GAL4 > RNAi-tefu* относительно особей обеих родительских линий (рис. 7а,б, табл. 7). Так, у самцов, получавших KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ, наблюдали увеличение медианной выживаемости на 113 и 171% относительно родительской линии *da-GAL4* и на 89 и 111% относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 7). У варианта, получившего контрольную среду, обнаружено незначительное повышение выживаемости (13%) относительно родительской линии *da-GAL4* (табл. 6). Обработка самок KU-60019 в концентрации 1 мкМ и в контроле привела к увеличению выживаемости на 47% относительно родительской линии *da-GAL4*. При обработке KU-60019 в концентрации 100 мкМ наблюдали снижение медианной выживаемости на 40% относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 8).

В условиях окислительного стресса добавление в корм самцам ингибитора KU-60019 в исследуемых концентрациях привело к увеличению медианной выживаемости на 44 и 58% относительно родительской линии *da-GAL4* (табл. 7). Также обнаружено, что выживаемость мух в контрольном варианте на 39% ниже, чем в родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 7). Обработка самок ингибитором KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ привела

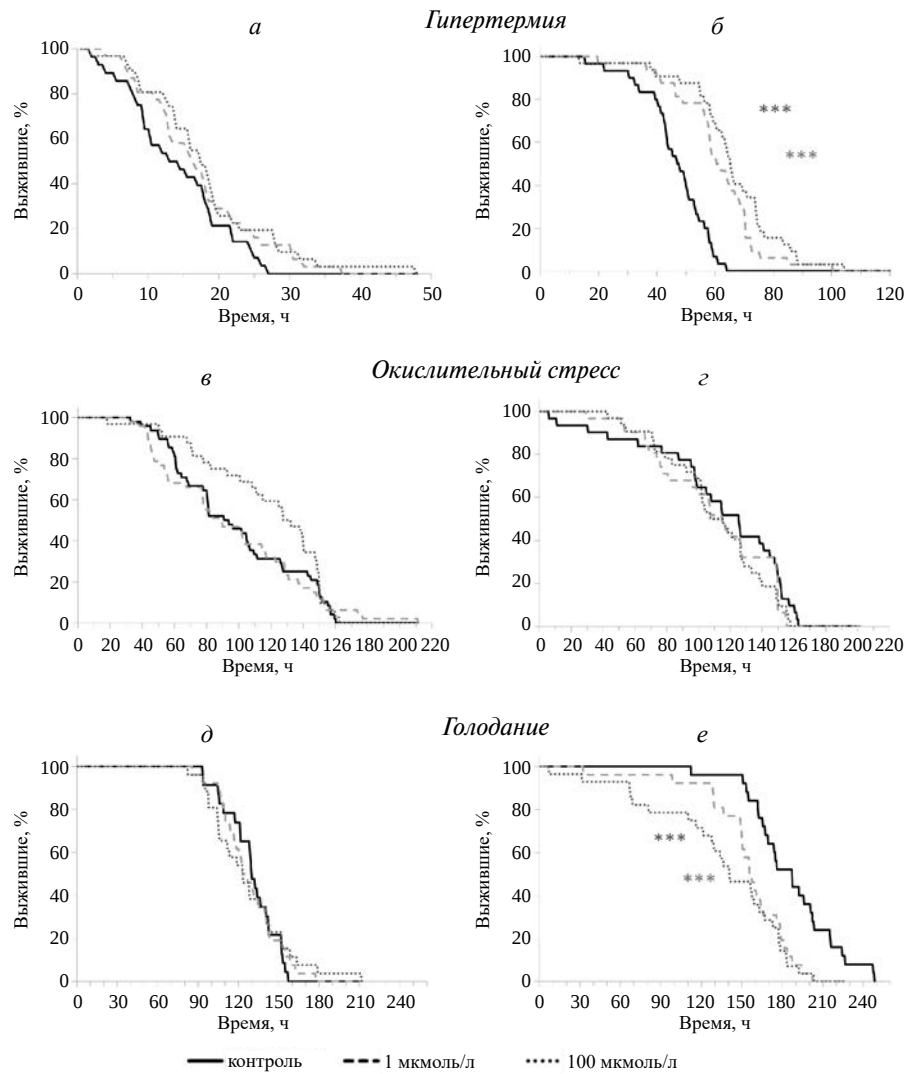
к увеличению выживаемости на 181 и 159% относительно родительской линии *da-GAL4* (табл. 8). В контрольном варианте наблюдали повышение медианной выживаемости на 19% относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 8).

Также обработка ингибитором KU-60019 привела к значительному увеличению времени выживаемости самцов и самок в условиях голодания (табл. 7 и 8). Ингибитор KU-60019 в обеих исследуемых концентрациях вызвал увеличение медианной выживаемости самцов на 10 и 21% относительно родительской линии *da-GAL4* и на 16 и 41% относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 7). В контрольном варианте также наблюдали увеличение выживаемости самцов на 21 и 31% относительно родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu* соответственно (табл. 7). У самок, получавших KU-60019 в концентрации 1 либо 100 мкМ, наблюдали повышение перцентилей выживаемости на 202 и 162% относительно родительской линии *da-GAL4* и на 121 и 68% относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* (табл. 8). У контрольного варианта увеличение выживаемости составило 219 и 102% относительно родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu* соответственно (табл. 8).

Эффекты обработки KU-60019 на медианное время выживаемости мух с РНК-интерференцией гена *tefu* в большинстве вариантов эксперимента подтверждаются влиянием на кривые выживаемости, которые смещены вправо по сравнению с контрольными вариантами ( $p < 0.001$ ) (рис. 7 и 8).

Таким образом, во всех использованных вариантах наблюдали повышение стрессоустойчивости самцов и самок *D. melanogaster* с РНК-интерференцией гена *tefu*, по сравнению с родительскими линиями *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu*.

Также оценили влияние ингибитора АТМ на спонтанную двигательную активность особей *D. melanogaster* с РНК-интерференцией гена *tefu*. Трехфакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимый ( $<0.001$ ) вклад возрас-



**Рис. 4.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на стрессоустойчивость самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) *D. virilis*. \*\*\* –  $p < 0.001$ , логранговый критерий с поправкой Бонферрони.

**Таблица 4.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 на стрессоустойчивость особей *D. virilis*

| Вариант                     | Пол | М, ч | dМ, % | Ф      | ЛР     | N  |
|-----------------------------|-----|------|-------|--------|--------|----|
| <i>Гипертермия</i>          |     |      |       |        |        |    |
| Контроль                    | ♂   | 13   | n/a   | n/a    | n/a    | 28 |
| 1 мкМ KU60019               | ♂   | 17   | +31   | >0.05  | >0.05  | 31 |
| 100 мкМ KU60019             | ♂   | 18   | +38   | >0.05  | <0.05  | 31 |
| Контроль                    | ♀   | 48   | n/a   | n/a    | n/a    | 30 |
| 1 мкМ KU60019               | ♀   | 61   | +27   | <0.001 | <0.001 | 32 |
| 100 мкМ KU60019             | ♀   | 66   | +38   | <0.001 | <0.001 | 32 |
| <i>Окислительный стресс</i> |     |      |       |        |        |    |
| Контроль                    | ♂   | 91   | n/a   | n/a    | n/a    | 30 |
| 1 мкМ KU60019               | ♂   | 90   | –1    | >0.05  | >0.05  | 32 |
| 100 мкМ KU60019             | ♂   | 128  | +41   | <0.01  | >0.05  | 32 |
| Контроль                    | ♀   | 126  | n/a   | n/a    | n/a    | 31 |
| 1 мкМ KU60019               | ♀   | 115  | –9    | >0.05  | >0.05  | 31 |
| 100 мкМ KU60019             | ♀   | 108  | –14   | >0.05  | >0.05  | 32 |

Таблица 4. Окончание

| Вариант         | Пол | М, ч | dM, % | Ф     | ЛР     | N  |
|-----------------|-----|------|-------|-------|--------|----|
| Голодание       |     |      |       |       |        |    |
| Контроль        | ♂   | 130  | n/a   | n/a   | n/a    | 30 |
| 1 мкМ KU60019   | ♂   | 127  | –2    | >0.05 | >0.05  | 32 |
| 100 мкМ KU60019 | ♂   | 124  | –5    | >0.05 | >0.05  | 32 |
| Контроль        | ♀   | 188  | n/a   | n/a   | n/a    | 30 |
| 1 мкМ KU60019   | ♀   | 156  | –17   | <0.05 | <0.001 | 32 |
| 100 мкМ KU60019 | ♀   | 141  | –25   | <0.01 | <0.001 | 32 |

та, генотипа и их взаимодействия на спонтанную двигательную активность самцов и самок (табл. 9, рис. 9). Однако обработка ингибитором не привела к статистически значимому изменению спонтанной двигательной активности дрозофил. Пост-хок тест Тьюки показал статистически значимое изменение двигательной активности у трехнедельных самцов с подавленной в результате РНК-интерференции экспрессией гена *tefu* на контрольной среде относительно обеих родительских линий ( $p = 0.00004$ ) (рис. 9а,б). Небольшие изменения в спонтанной активности обнаружены также у четырехнедельных самок с РНК-интерференцией гена *tefu* на контрольной среде относительно родительской линии *UAS-RNAi-tefu* ( $p = 0.0028$ ) (рис. 9г). В остальных вариантах эксперимента различий не наблюдали. Также стоит отметить, что относительно родительской линии *da-GAL4* результаты были рассчитаны по 6 неделе включительно, поскольку эта линия имеет короткую ПЖ. Таким образом, дисперсионный анализ выявил статистически значимый вклад возраста, генотипа и их взаимодействия, но не выявил эффектов обработки ингибитором на суммарную спонтанную двигательную активность самцов и самок *D. melanogaster* с РНК-интерференцией гена *tefu*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании проанализирован геропротекторный потенциал KU-60019 — специфического ингибитора киназы ATM ( $IC_{50} = 6.3$  нМ), в концентрации 1 и 100 мкМ [43]. В работах, выполненных на сенесцентных диплоидных фибробластах человека, линиях фибробластов с мутацией ATM, а также на стареющих фибробластах человека линий HGPS и WS, KU-60019 был описан как эффективный агент [27, 28], замедляющий как спонтанное, так и ускоренное старение клеток в культуре.

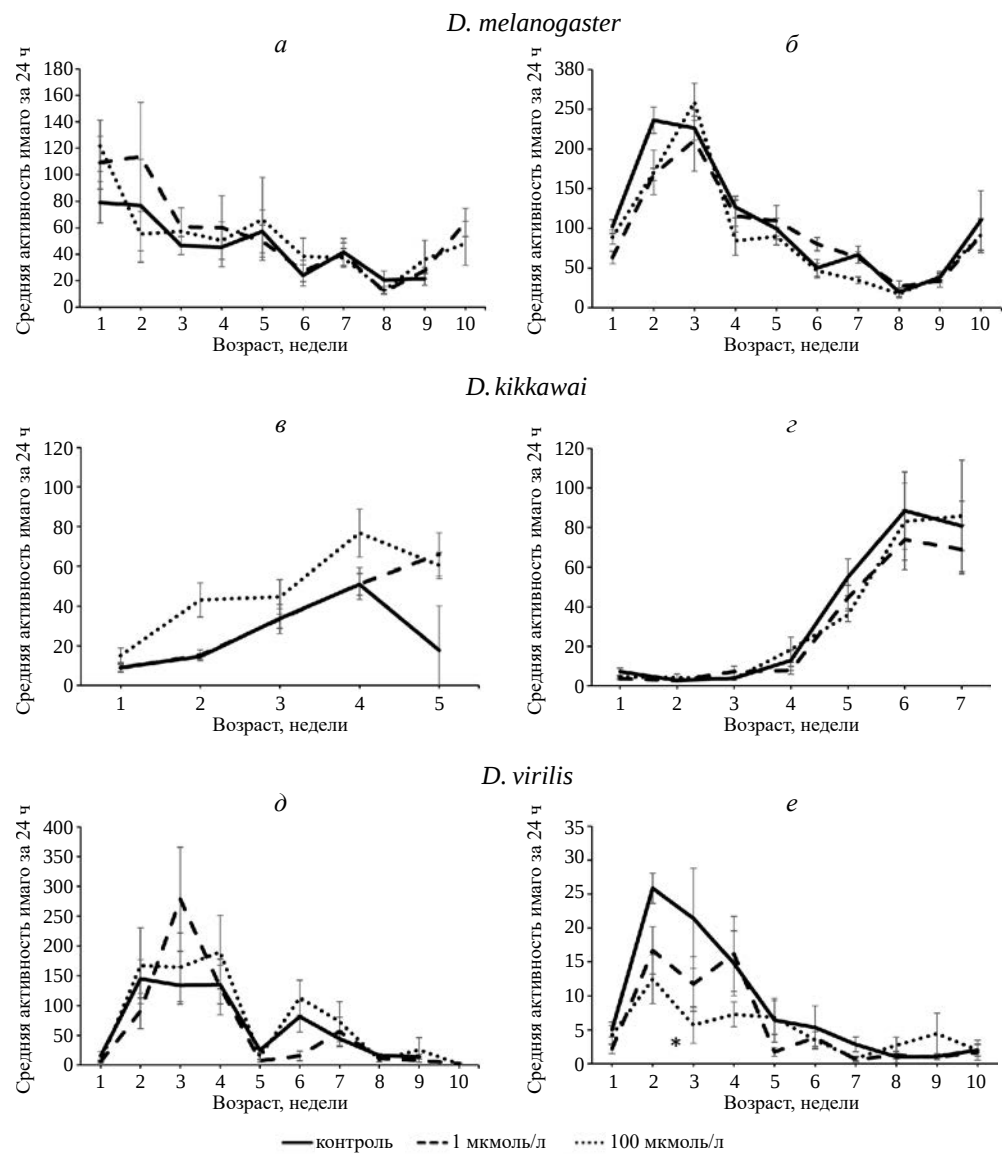
Для выявления эффектов KU-60019 на ПЖ целого организма мы использовали особей разных видов *Drosophila*. Согласно сформулированным ранее критериям геропротектора, исследования на различных модельных организмах снижают риск обнаружения видоспеци-

фичных эффектов [44]. В связи с этим, в данной работе мы изучали геропротекторные эффекты KU-60019 на особях трех видов *Drosophila*, различающихся по ПЖ [35, 45–47].

Оценивая геропротекторные эффекты KU-60019, мы обнаружили, что обработка этим соединением увеличивает медианную и максимальную ПЖ самцов и самок *D. virilis* (долгоживущий вид), а также медианную ПЖ самок *D. melanogaster* (вид с умеренной ПЖ). У особей обоих полов *D. kikkawai* (короткоживущий вид) наблюдали снижение медианной и максимальной ПЖ. Таким образом, нами не отмечена воспроизводимость геропротекторного эффекта KU-60019 на особях разных видов несмотря на эволюционную консервативность мишени.

Интересно, что ранее в работе, посвященной геропротекторным свойствам антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина (НАС), мы также обнаружили различия в геропротекторных эффектах между особями разного вида и пола [35]. Опубликованные на сегодняшний день экспериментальные данные свидетельствуют о том, что полспецифичные эффекты геропротекторных вмешательств в целом и фармакологических соединений в частности, характерны для разных модельных организмов, включая *D. melanogaster* [48] и другие виды дрозофил [35]. В недавнем обзоре Lushchak и соавт. пришли к выводу, что разная чувствительность к фармакологическим геропротекторным вмешательствам самцов и самок *D. melanogaster* прежде всего зависит от генетического фона, статуса спаривания, дозы вещества и продолжительности его воздействия. Однако мало известно о механизмах, лежащих в основе половых различий в ответе на геропротекторные вмешательства.

Кроме того, ранее было показано, что KU-60019 снижает пролиферативную активность опухолевых клеток [49, 50]. В опубликованных на сегодняшний день исследованиях отсутствуют прямые доказательства того, что KU-60019 влияет на репродуктивную функцию благодаря своей антипролиферативной активности, однако не исключено, что он может



**Рис. 5.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на спонтанную двигательную активность самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) *D. melanogaster* (а, б), *D. kikkawai* (в, г) и *D. virilis* (д, е). \* $p < 0.024$ , пост-хок тест Тьюки. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего.

**Таблица 5.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния возраста и обработки на спонтанную двигательную активность *Drosophila*

| Фактор                 | Пол | SS       | DF  | MS      | F      | <i>p</i> |
|------------------------|-----|----------|-----|---------|--------|----------|
| <i>D. melanogaster</i> |     |          |     |         |        |          |
| Возраст                | ♂   | 9103996  | 9   | 1011555 | 7.3082 | 0.0000   |
| Обработка              |     | 526307   | 2   | 263153  | 1.9012 | 0.1543   |
| Возраст × Обработка    |     | 1658673  | 18  | 92149   | 0.6657 | 0.8376   |
| Ошибка                 |     | 15087080 | 109 | 138414  |        |          |
| Возраст                | ♀   | 59785003 | 9   | 6642778 | 48.895 | 0.0000   |
| Обработка              |     | 635665   | 2   | 317833  | 2.339  | 0.1008   |
| Возраст × Обработка    |     | 3233734  | 18  | 179652  | 1.322  | 0.1860   |
| Ошибка                 |     | 16303110 | 120 | 135859  |        |          |

Таблица 5. Окончание

| Фактор              | Пол | SS       | DF  | MS      | F       | p      |
|---------------------|-----|----------|-----|---------|---------|--------|
| <i>D. kikkawai</i>  |     |          |     |         |         |        |
| Возраст             | ♂   | 2424900  | 4   | 606225  | 24.2923 | 0.0000 |
| Обработка           |     | 379003   | 2   | 189501  | 7.5936  | 0.0012 |
| Возраст × Обработка |     | 240421   | 8   | 30053   | 1.2043  | 0.3131 |
| Ошибка              |     | 1422459  | 57  | 24955   |         |        |
| Возраст             | ♀   | 13131203 | 6   | 2188534 | 47.2365 | 0.0000 |
| Обработка           |     | 73516    | 2   | 36758   | 0.7934  | 0.4558 |
| Возраст × Обработка |     | 208227   | 12  | 17352   | 0.3745  | 0.9690 |
| Ошибка              |     | 3752843  | 81  | 46331   |         |        |
| <i>D. virilis</i>   |     |          |     |         |         |        |
| Возраст             | ♂   | 64863337 | 9   | 7207037 | 14.9087 | 0.0000 |
| Обработка           |     | 783743   | 2   | 391871  | 0.8106  | 0.4470 |
| Возраст × Обработка |     | 10545469 | 18  | 585859  | 1.2119  | 0.2624 |
| Ошибка              |     | 58009374 | 120 | 483411  |         |        |
| Возраст             | ♀   | 470005.7 | 9   | 52222.9 | 14.1183 | 0.0000 |
| Обработка           |     | 36097.7  | 2   | 18048.8 | 4.8795  | 0.0092 |
| Возраст × Обработка |     | 109012.1 | 18  | 6056.2  | 1.6373  | 0.0617 |
| Ошибка              |     | 432775.7 | 117 | 3698.9  |         |        |

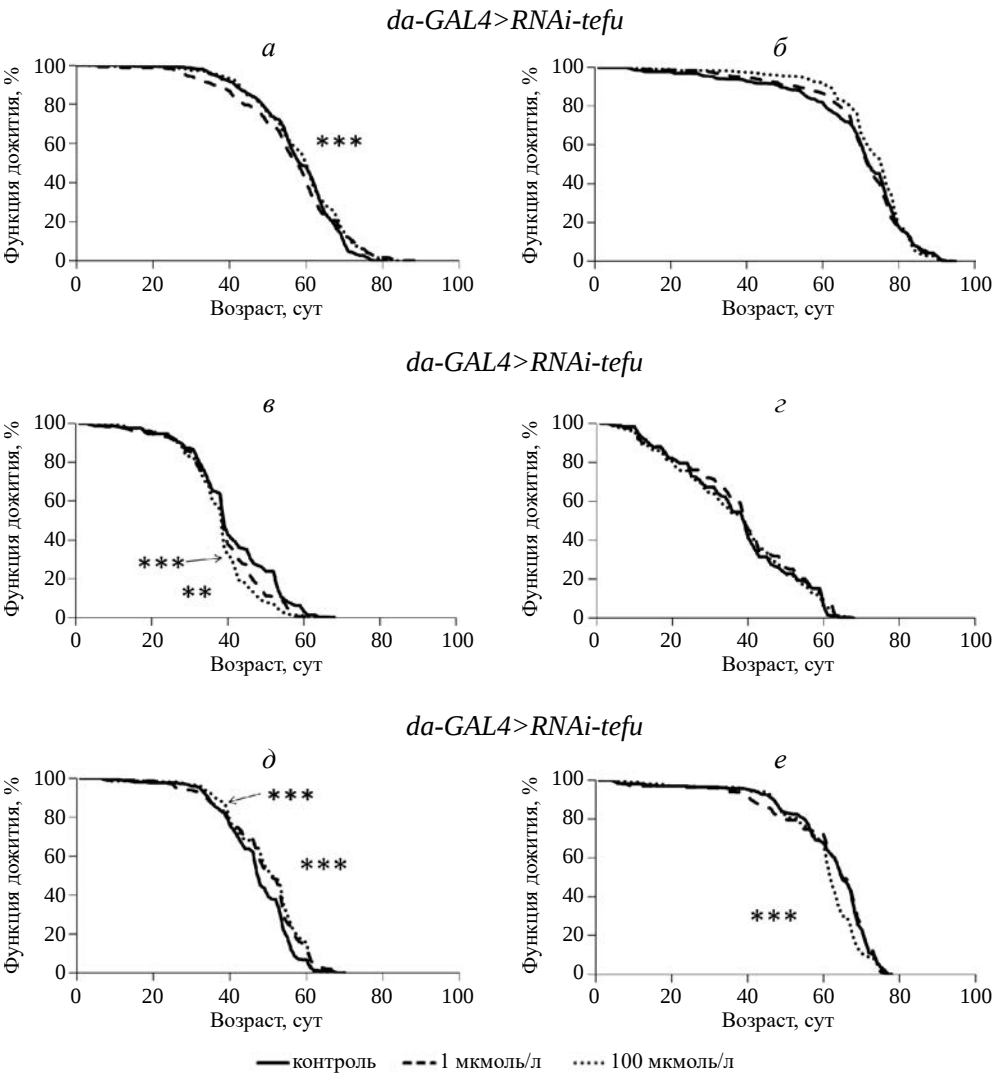
Примечание. ♂ – самцы, ♀ – самки, SS – сумма квадратов отклонений, DF – число степеней свободы, MS – дисперсия, F – фактическое значение отношения Фишера, p – уровень значимости.

снижать репродуктивный потенциал дрозофил, модифицируя влияние на ПЖ. Однако необходимы дополнительные исследования эффектов KU-60019 на репродукцию мух.

Как показывают наши предыдущие исследования, биологическая основа межвидовых различий как в ПЖ, так и в эффектах фармакологических вмешательств может обуславливаться транскриптомными [47] и метаболомными [46] особенностями видов. Ранее нами были установлены существенные различия в паттернах глобальной экспрессии генов у представителей рода *Drosophila* [47]. В частности, долгоживущие виды мух отличались от короткоживущих повышением активности генов, вовлеченных в метаболизм жирных кислот, снижением транскрипции генов, связанных с развитием нервной системы, передачей сигналов активина, сплайсингом РНК [47]. Сравнительное исследование метаболомных профилей разных видов *Drosophila* также выявило характеристики, связанные с высокой ПЖ. Полученные результаты показывают, что продление жизни связано с повышением уровня метаболизма аминокислот, фосфолипидов и углеводов [46]. Вероятно, данные механизмы опосредуют межвидовые различия геропротекторных эффектов KU-60019.

В свою очередь, особи *D. kikkawai* характеризуются не только короткой ПЖ, но и сниженной устойчивостью ко многим факторам стресса [45]. Долгосрочное (на протяжении всей жизни имаго) подавление активности белка АТМ, являющегося ключевым регулятором клеточного ответа на повреждение ДНК, могло сыграть критическую роль в жизнеспособности особей данного вида и ускорить их старение.

Стоит отметить, что в противоположность полученным нами данным, в некоторых публикациях показан геропротекторный эффект активации АТМ. Так, на мышах, моделирующих атаксию-телеангиэктазию, показано, что стимуляция активности АТМ приводит к замедлению старения и продлевает им жизнь [51]. Кроме того, некоторые геропротекторы активируют АТМ. Например, методами *in vitro* показано прямое стимулирующее действие ресвератрола на очищенный АТМ. Как в нормальных, так и в трансформированных линиях клеток человека аутофосфорилирование АТМ и фосфорилирование субстрата стимулируется ресвератролом по механизму, регулируемому активными формами кислорода [52]. Показано также, что митофагический эффект геропротектора спермидина связан с активацией АТМ-зависимого сигнального пути [53].



**Рис. 6.** Роль гена *tefu* во влиянии ингибитора ATM KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на продолжительность жизни самцов (а, в, д) и самок (б, з, е) *D. melanogaster*. \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.0001$  – логранговый критерий с поправкой Бонферрони.

**Таблица 6.** Роль гена *tefu* в формировании эффектов ингибитора ATM KU-60019 на продолжительность жизни самцов и самок *D. melanogaster*

| Генотип                       | Обработка KU-60019, мкМ | Пол | М, сут | dM, % | Φ       | 90%, сут | d90%, % | BA      | Φ       | N   |
|-------------------------------|-------------------------|-----|--------|-------|---------|----------|---------|---------|---------|-----|
| <i>da-GAL4 &gt; RNAi-tefu</i> | контроль                | ♂   | 59     | n/a   | n/a     | 70       | n/a     | n/a     | n/a     | 614 |
|                               | 1                       | ♂   | 59     | 0     | >0.05   | 74       | +6      | <0.0001 | <0.0001 | 584 |
|                               | 100                     | ♂   | 61     | +3    | >0.05   | 73       | +4      | <0.0001 | <0.0001 | 610 |
| <i>da-GAL4</i>                | контроль                | ♂   | 39     | -51*  | <0.0001 | 55       | -27*    | <0.0001 | <0.0001 | 304 |
|                               | 1                       | ♂   | 39     | 0     | >0.05   | 53       | -4      | <0.0001 | >0.05   | 303 |
|                               | 100                     | ♂   | 39     | 0     | <0.01   | 49       | -11     | <0.0001 | <0.001  | 306 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>          | контроль                | ♂   | 48     | -23*  | <0.0001 | 57       | -22*    | <0.0001 | <0.0001 | 301 |
|                               | 1                       | ♂   | 51     | +6    | <0.05   | 61       | +7      | <0.0001 | <0.05   | 310 |
|                               | 100                     | ♂   | 51     | +6    | <0.01   | 61       | +7      | <0.0001 | >0.05   | 308 |
| <i>da-GAL4 &gt; RNAi-tefu</i> | контроль                | ♀   | 73     | n/a   | n/a     | 84       | n/a     | n/a     | n/a     | 608 |
|                               | 1                       | ♀   | 72     | -1    | >0.05   | 84       | 0       | >0.05   | >0.05   | 606 |
|                               | 100                     | ♀   | 76     | +4    | <0.01   | 84       | 0       | >0.05   | >0.05   | 598 |

Таблица 6. Окончание

| Генотип              | Обработка КУ–60019, мкМ | Пол | М, сут | dM, % | Φ       | 90%, сут | d90%, % | BA      | Φ       | N   |
|----------------------|-------------------------|-----|--------|-------|---------|----------|---------|---------|---------|-----|
| <i>da-GAL4</i>       | контроль                | ♀   | 39     | –87*  | <0.0001 | 60       | –40*    | <0.0001 | <0.0001 | 303 |
|                      | 1                       | ♀   | 39     | 0     | >0.05   | 60       | 0       | <0.0001 | >0.05   | 311 |
|                      | 100                     | ♀   | 40     | +3    | >0.05   | 60       | 0       | <0.0001 | >0.05   | 300 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                | ♀   | 65     | –12*  | <0.0001 | 74       | –13*    | <0.0001 | <0.0001 | 311 |
|                      | 1                       | ♀   | 65     | 0     | >0.05   | 74       | 0       | <0.0001 | >0.05   | 308 |
|                      | 100                     | ♀   | 62     | –5    | <0.0001 | 71       | –4      | <0.0001 | >0.05   | 303 |

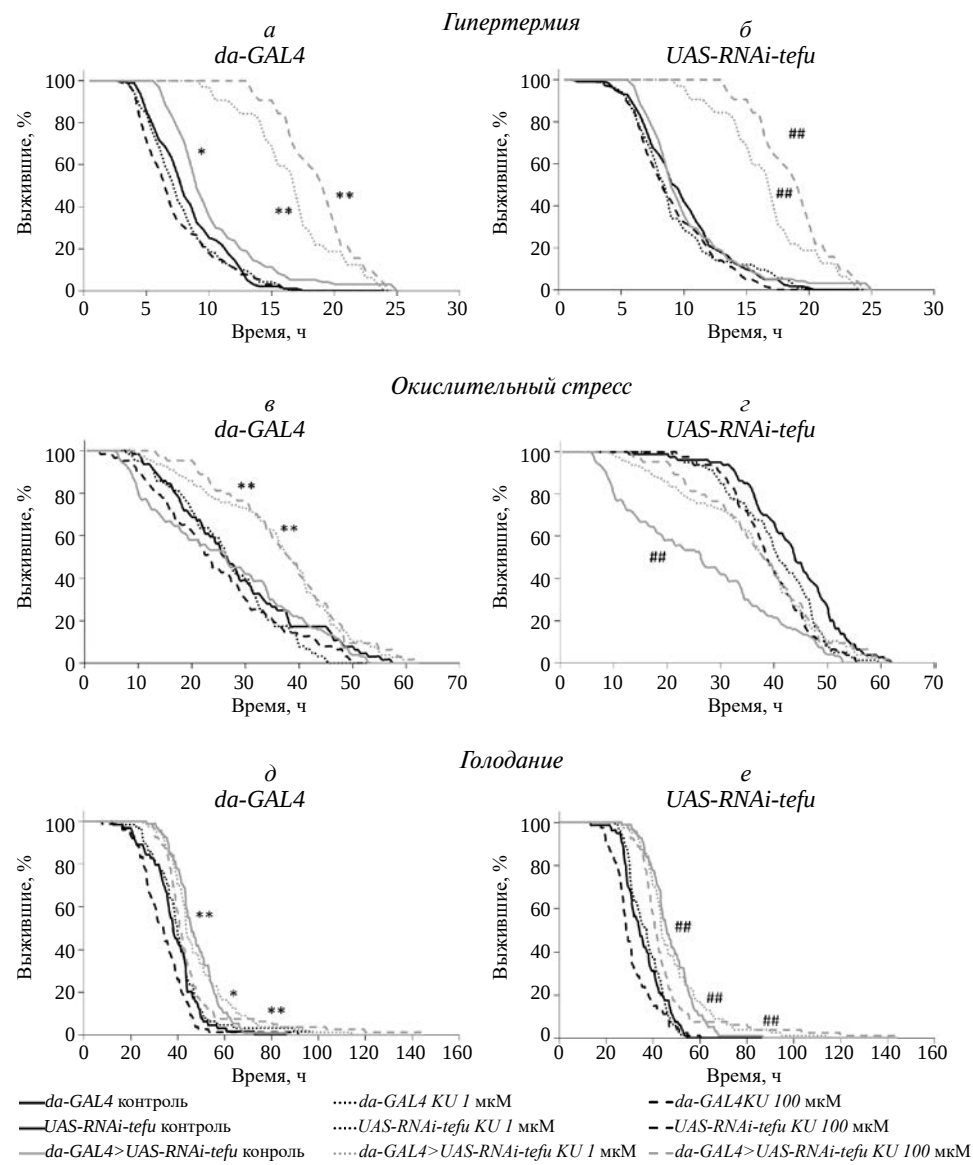
Примечание. ♂ – самцы, ♀ – самки, М, сут – медианная продолжительность жизни (сут), dM, % – различия в медианной продолжительности жизни между контрольными и экспериментальными линиями (%), 90%, сут – возраст гибели 90% особей выборки (сут), d90%, % – различия возраста 90% смертности между контрольными и экспериментальными линиями (%), BA – значение *p* по тесту Ванг–Аллисона, Φ – значение *p* по точному критерию Фишера, N – количество особей в выборке, n/a – неприменимо, \*различия между родительскими линиями *da-GAL4*, *UAS-RNAi-tefu* и линией с нокдауном *tefu da-GAL4 > RNAi-tefu*.

Согласно предложенным ранее критериям геропротектора, потенциальные геропротекторы характеризуются способностью повышать устойчивость организма к неблагоприятным факторам внешней среды [44]. Поэтому нами исследовано влияние КУ-60019 на стрессоустойчивость особей трех видов *Drosophila*. Изучено также влияние КУ-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на выживаемость в условиях гипертермии (35°C), при обработке индуктором окислительного стресса паракватом (20 мМ) и при голодании. Обнаружено, что обработка ингибитором в обеих концентрациях повышала выживаемость изучаемых видов дрозофил в условиях стресса. Мы связываем этот эффект с положительным влиянием ингибитора КУ-60019 на функциональное восстановление системы лизосомы/аутофагия, которое сопровождается восстановлением функций митохондрий и метаболическим перепрограммированием [54, 55].

Установлено, что одной из причин нарушения функций организма при действии стресс-факторов различной этиологии является снижение стабильности мембран лизосом [56, 57]. Нарушение работы лизосом при окислительном стрессе или повреждении свободными радикалами приводит к старению и гибели клетки за счет нарушения аутофагии, ингибирования лизосомных ферментов и повреждения лизосомных мембран [58, 59]. Показано, что V-АТРаза вовлечена в поддержание гомеостаза внутриклеточных уровней меди и железа и играет важную роль в Sod2-опосредованной реакции на окислительный стресс [60]. Клетки получают необходимые питательные вещества из окружающей среды и используют адаптивные механизмы для выживания в условиях дефицита питательных веществ. Как питательные вещества перемещаются и распределяются внутри клеток, а также запасаются ли они в ответ на стресс, остается малоизученным. Показано, что в ответ

на голодание, вызванное недостатком глюкозы, запускается механизм деградации мембран. Этот механизм включает в себя липидирование белка аутофагии LC3 на лизосомных мембранах и образование внутриклеточных везикул посредством микроаутофагии [61]. При этом голодание индуцирует лизосомное хранение лейцина [62]. В ответ на тепловой шок (гипертермию) в клетках немедленно индуцируются гены, кодирующие белки теплового шока, которые запускают связанные с лизосомной системой процессы: гибель клеток, аутофагию и защиту от пермеабиллизации лизосомной мембраны [63, 64].

Важной характеристикой качества жизни и жизнеспособности животных является физическая активность. С возрастом происходит снижение нервно-мышечной активности и изменение поведенческих реакций [65–68]. Согласно критериям геропротектора [44], соединения с геропротекторным потенциалом должны улучшать качество жизни, в том числе замедлять скорость возрастзависимого снижения локомоторной активности. Однако нами установлено, что обработка особей *D. melanogaster* и *D. kikkawai* КУ-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ не оказывает влияния на возрастзависимое изменение активности. В то же время, отмечено достоверное снижение спонтанной активности у трехнедельных самок *D. virilis*, получавших КУ-60019 в концентрации 100 мкМ. Эти данные не подтверждают гипотезу о поддержании функциональности мышечных клеток вследствие деградации поврежденных митохондрий при обработке КУ-60019. В целом же полученные данные не исключают антивозрастного действия КУ-60019 на популяцию митохондрий, поскольку нарушение функций митохондрий с возрастом ведет не только к нарушению работы нервно-



**Рис. 7.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на стрессоустойчивость самцов *D. melanogaster* с подавленной экспрессией гена *tefu*. \* –  $p < 0.001$ , \*\* и ## –  $p < 0.0001$  относительно родительской линии *da-GAL4* (а, в, д) и *UAS-RNAi-tefu* (б, г, е), соответственно, логранговый критерий.

**Таблица 7.** Влияние ингибитора АТМ KU-60019 на стрессоустойчивость самцов *D. melanogaster* при РНК-интерференции гена *tefu*

| Вариант                               | Обработка KU-60019, мкМ | М, ч | dM, %   | $\Phi$ (p) | ЛР (p)   | N   |
|---------------------------------------|-------------------------|------|---------|------------|----------|-----|
| <i>Гипертермия</i>                    |                         |      |         |            |          |     |
| <i>da-GAL4</i>                        | контроль                | 8    | +12.5*  | <0.0001*   | <0.001*  | 95  |
|                                       | 1                       | 8    | +112.5* | <0.0001*   | <0.0001* | 95  |
|                                       | 100                     | 7    | +171.4* | <0.0001*   | <0.0001* | 128 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>                  | контроль                | 10   | –10.0#  | <0.0001#   | >0.05#   | 124 |
|                                       | 1                       | 9    | +88.9#  | <0.0001#   | <0.0001# | 127 |
|                                       | 100                     | 9    | +111.1# | <0.0001#   | <0.0001# | 128 |
| <i>da-GAL4</i> > <i>UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                | 9    | n/a     | n/a        | n/a      | 96  |
|                                       | 1                       | 17   | n/a     | n/a        | n/a      | 32  |
|                                       | 100                     | 19   | n/a     | n/a        | n/a      | 32  |

Таблица 7. Окончание

| Вариант                           | Обработка<br>KU-60019, мкМ | М, ч | dM, %  | Φ (p)    | ЛР (p)   | N   |
|-----------------------------------|----------------------------|------|--------|----------|----------|-----|
| <i>Окислительный стресс</i>       |                            |      |        |          |          |     |
| <i>da-GAL4</i>                    | контроль                   | 26   | +3.8*  | >0.05*   | >0.05*   | 64  |
|                                   | 1                          | 27   | +44.4* | <0.0001* | <0.0001* | 63  |
|                                   | 100                        | 24   | +58.3* | <0.0001* | <0.0001* | 63  |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>              | контроль                   | 44   | –38.6# | <0.0001# | <0.0001# | 80  |
|                                   | 1                          | 41   | –4.9#  | >0.05#   | >0.05#   | 80  |
|                                   | 100                        | 39   | –2.6#  | >0.05#   | >0.05#   | 80  |
| <i>da-GAL4 &gt; UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                   | 27   | n/a    | n/a      | n/a      | 126 |
|                                   | 1                          | 39   | n/a    | n/a      | n/a      | 78  |
|                                   | 100                        | 38   | n/a    | n/a      | n/a      | 64  |
| <i>Голодание</i>                  |                            |      |        |          |          |     |
| <i>da-GAL4</i>                    | контроль                   | 38   | +21.1* | <0.0001* | <0.0001* | 64  |
|                                   | 1                          | 40   | +10.0* | <0.0001* | <0.001*  | 63  |
|                                   | 100                        | 34   | +20.6* | <0.0001* | <0.0001* | 76  |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>              | контроль                   | 35   | +31.4# | <0.0001# | <0.0001# | 80  |
|                                   | 1                          | 38   | +15.8# | <0.0001# | <0.0001# | 78  |
|                                   | 100                        | 29   | +41.4# | <0.0001# | <0.0001# | 80  |
| <i>da-GAL4 &gt; UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                   | 46   | n/a    | n/a      | n/a      | 95  |
|                                   | 1                          | 44   | n/a    | n/a      | n/a      | 78  |
|                                   | 100                        | 41   | n/a    | n/a      | n/a      | 80  |

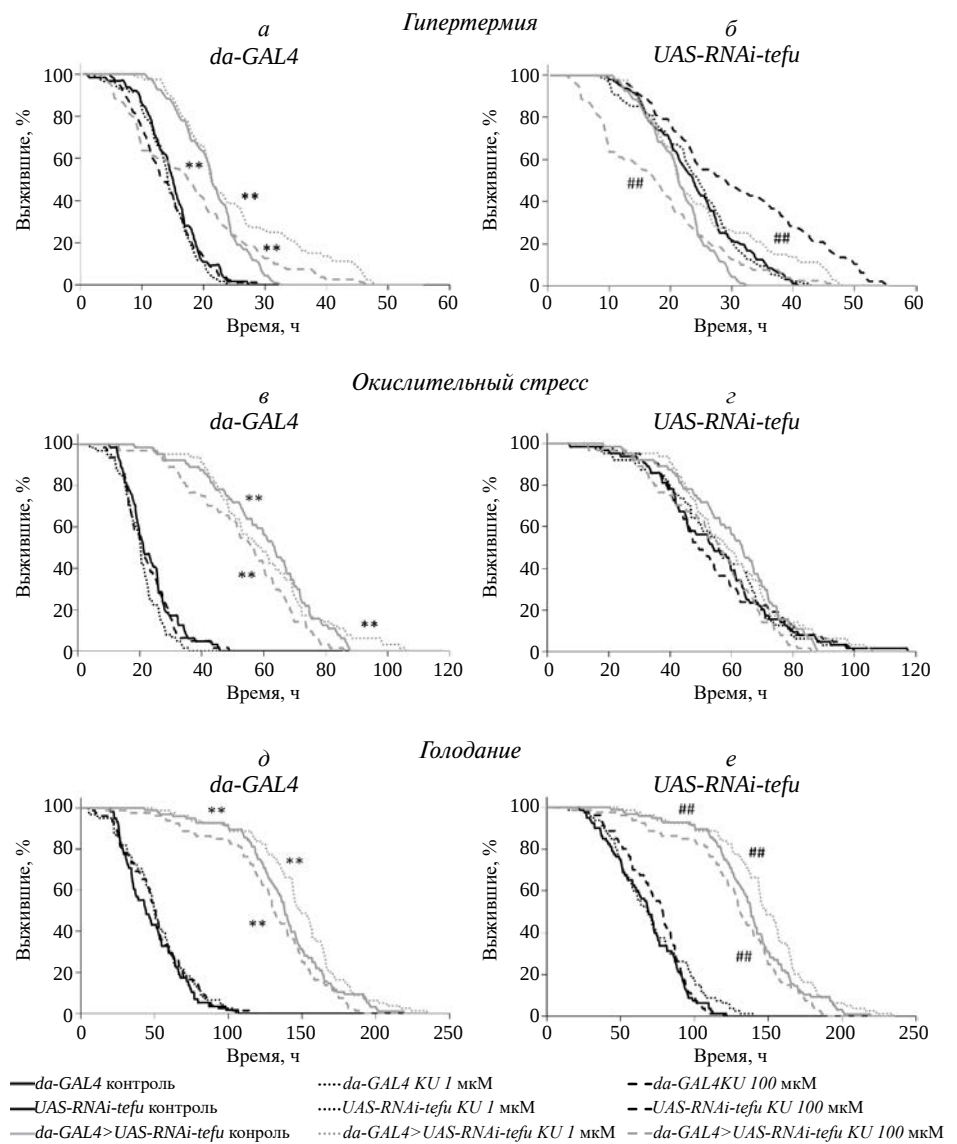
Примечание. Здесь и в табл. 8. М, ч – время медианной выживаемости (ч), dM, % – различия медианной выживаемости у контрольных и экспериментальных мух:  $dM^* = M(da-GAL4 > UAS-RNAi-tefu) - M(da-GAL4)$  или  $dM^\# = M(da-GAL4 > UAS-RNAi-tefu) - M(UAS-RNAi-tefu)$ , Φ (p) – значение p по точному критерию Фишера, ЛР (p) – значение p по логранговому критерию. Представлены значения, полученные при сравнении показателей экспериментальной линии *da-GAL4 > UAS-RNAi-tefu* относительно родительских линий *da-GAL4* (\*) и *UAS-RNAi-tefu* (#), n/a – неприменимо, N – количество особей в выборке.

мышечной системы, но и к индукции фенотипа старения [69].

Стоит отметить, что в отличие от *D. melanogaster* и *D. virilis*, спонтанная двигательная активность особей *D. kikkawai* не снижалась с возрастом, а напротив, несколько возрастала. Несмотря на то, что в целом не обнаружено корреляции между ПЖ и локомоторной активностью мух [70, 71], ранее мы выявили обратную взаимосвязь между долгожительством и двигательной активностью мух, содержащихся в темноте или при пониженной температуре [72], что предполагает сложную взаимосвязь данных показателей и их зависимость от внешних факторов. На сегодняшний день сложно объяснить причины увеличения спонтанной локомоторной активности *D. kikkawai* с возрастом, но с учетом ряда генетических [47], метаболических [46] и поведенческих [73] различий между коротко- и долгоживущими видами, можно предположить установление компромисса между двигательной активностью и ПЖ особей данного вида. Видовые особенности генома и метаболома также могут быть причиной различий в показателях функционального старения организма (на примере локомоторной

активности) и различий во влиянии ингибитора АТМ на ПЖ.

Для верификации продукта гена *tefu*, как мишени KU-60019, мы проанализировали эффекты ингибитора АТМ на те же физиологические показатели у линии с нокдауном, вызванным РНК-интерференцией гена *tefu*. Обнаружено увеличение медианной и максимальной ПЖ у особей с репрессией гена *tefu* (*da-GAL4 > RNAi-tefu*) по сравнению с особями контрольных родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu*. Стоит отметить, что несмотря на геропротекторный и адаптогенный эффект нокдауна гена *tefu*, мутации в данном гене приводят к высокой летальности дрозидов на разных стадиях предимагинального развития, радиочувствительности и короткой ПЖ жизни. Так, мутантный аллель *tefu<sup>stg</sup>* (FBal0175409) характеризуется высокой радиочувствительностью и летальностью на стадии куколки [74, 75]. Аллель с потерей функции АТМ – *tefu<sup>atm-4</sup>* (FBal0175414) летален [14]. Мутация *tefu<sup>atm-6</sup>* (FBal0175412) обладает высокой летальностью на стадии куколки и радиочувствительностью [14, 76]. Фенотип мух с аллелем *tefu<sup>atm-8</sup>* (FBal0175410) характеризуется короткой ПЖ,



**Рис. 8.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на стрессоустойчивость самок *D. melanogaster* с РНК-интерференцией гена *tefu*. \*\* и ## –  $p < 0.0001$  относительно родительской линии *da-GAL4* (а, в, д) и *UAS-RNAi-tefu* (б, г, е), соответственно, логранговый критерий.

**Таблица 8.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 на стрессоустойчивость самок *D. melanogaster* при РНК-интерференции гена *tefu*

| Вариант                           | Обработка KU-60019, мкМ | М, ч | dM, %  | Φ (p)    | ЛР (p)   | N  |
|-----------------------------------|-------------------------|------|--------|----------|----------|----|
| <i>Гипертермия</i>                |                         |      |        |          |          |    |
| <i>da-GAL4</i>                    | контроль                | 15   | +46.7* | <0.0001* | <0.0001* | 64 |
|                                   | 1                       | 15   | +46.7* | <0.0001* | <0.0001* | 59 |
|                                   | 100                     | 14   | +28.6* | >0.05*   | <0.0001* | 90 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>              | контроль                | 24   | –8.3#  | >0.05#   | <0.0002# | 96 |
|                                   | 1                       | 25   | –12.0# | >0.05#   | >0.05#   | 95 |
|                                   | 100                     | 30   | –40.0# | <0.0001# | <0.0001# | 96 |
| <i>da-GAL4 &gt; UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                | 22   | n/a    | n/a      | n/a      | 95 |
|                                   | 1                       | 22   | n/a    | n/a      | n/a      | 80 |
|                                   | 100                     | 18   | n/a    | n/a      | n/a      | 80 |

Таблица 8. Окончание

| Вариант                           | Обработка<br>KU-60019, мкМ | М, ч | dM, %   | Φ (p)    | ЛР (p)   | N  |
|-----------------------------------|----------------------------|------|---------|----------|----------|----|
| <i>Окислительный стресс</i>       |                            |      |         |          |          |    |
| <i>da-GAL4</i>                    | контроль                   | 22   | +190.9* | <0.0001* | <0.0001* | 64 |
|                                   | 1                          | 21   | +181.0* | <0.0001* | <0.0001* | 63 |
|                                   | 100                        | 22   | +159.1* | <0.0001* | <0.0001* | 63 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>              | контроль                   | 54   | +18.5#  | >0.05#   | >0.05#   | 63 |
|                                   | 1                          | 56   | +5.4#   | >0.05#   | >0.05#   | 64 |
|                                   | 100                        | 50   | +14.0#  | >0.05#   | >0.05#   | 63 |
| <i>da-GAL4 &gt; UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                   | 64   | n/a     | n/a      | n/a      | 64 |
|                                   | 1                          | 59   | n/a     | n/a      | n/a      | 64 |
|                                   | 100                        | 57   | n/a     | n/a      | n/a      | 64 |
| <i>Голодание</i>                  |                            |      |         |          |          |    |
| <i>da-GAL4</i>                    | контроль                   | 43   | +218.6* | <0.0001* | <0.0001* | 58 |
|                                   | 1                          | 49   | +202.0* | <0.0001* | <0.0001* | 61 |
|                                   | 100                        | 50   | +162.0* | <0.0001* | <0.0001* | 78 |
| <i>UAS-RNAi-tefu</i>              | контроль                   | 68   | +101.5# | <0.0001# | <0.0001# | 80 |
|                                   | 1                          | 67   | +120.9# | <0.0001# | <0.0001# | 80 |
|                                   | 100                        | 78   | +67.9#  | <0.0001# | <0.0001# | 80 |
| <i>da-GAL4 &gt; UAS-RNAi-tefu</i> | контроль                   | 137  | n/a     | n/a      | n/a      | 87 |
|                                   | 1                          | 148  | n/a     | n/a      | n/a      | 72 |
|                                   | 100                        | 131  | n/a     | n/a      | n/a      | 80 |

повышенной чувствительностью к гипертермии и нарушениями двигательной активности [12–14]. В то же время, как и в экспериментах на особях *Drosophila* разных видов, анализ спонтанной локомоторной активности не выявил статистически значимого влияния обработки ингибитором АТМ на спонтанную двигательную активность самцов и самок *D. melanogaster* с репрессированным в результате РНК-интерференции гена *tefu*.

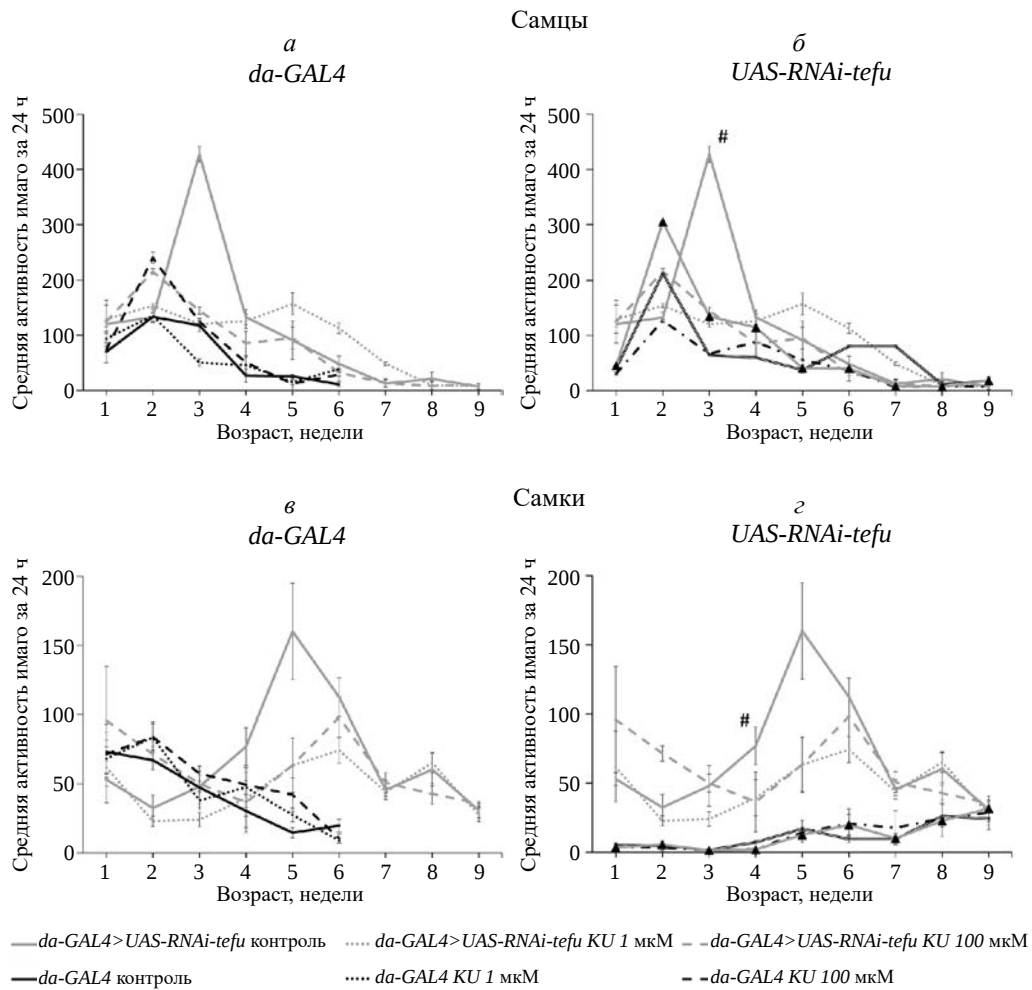
Также во всех вариантах исследования с использованием комбинации РНК-интерференции гена *tefu* и обработки KU-60019 наблюдали повышение стрессоустойчивости относительно родительских линий *da-GAL4* и *UAS-RNAi-tefu*. Повышение стрессоустойчивости, вызванное обработкой KU-60019 на фоне нокдауна гена *tefu* может быть связано с присутствием дополнительных молекулярных мишеней KU-60019, подавление которых может модифицировать эффекты, связанные с ингибированием АТМ. Например, KU-60019 может взаимодействовать не только с АТМ, но и с PIK3C3 (фосфатидилинозитол-3-киназа, каталитическая субъединица типа 3) [43], PRKDC (протеинкиназа, активируемая ДНК, каталитическая субъединица) [43], ATR (серин/треониновая киназа ATR) [43], ATXN2 (атаксин 2) [77], YES1 (протоонкоген YES 1, тирозинкиназа семейства Src) [78]. Эти молекулы вовлечены в регуляцию многих клеточных процессов,

связанных со старением, включая аутофагию, пролиферацию, дифференцировку, поддержание гомеостаза и выживание клеток, что может вести к модификации геропротекторного действия KU-60019.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, нами изучен геропротекторный потенциал KU-60019, селективного ингибитора АТМ, с использованием особей трех видов *Drosophila* с разной ПЖ. Полученные результаты свидетельствуют, что влияние KU-60019 на ПЖ зависит от вида *Drosophila*. Отмечено увеличение ПЖ самцов и самок долгоживущего вида *D. virilis* (на 3–10%) и самок *D. melanogaster* (на 3%) с умеренной ПЖ после обработки KU-60019, тогда как у особей короткоживущего вида *D. kikkawai* ПЖ снижалась (на 3–12%). Вместе с тем, обработка KU-60019 повышала выживаемость особей исследованных видов дрозофил в условиях гипертермии, окислительного стресса и голодания. По-видимому, эффекты KU-60019-опосредованного подавления активности АТМ на ПЖ в большой степени определяются особенностями транскриптомов, выявленными нами в более ранних исследованиях.

Кроме того, при интерпретации эффектов KU-60019 необходимо учитывать дополнительные молекулярные мишени, которые вовлечены в регуляцию многих клеточных



**Рис. 9.** Влияние ингибитора ATM KU-60019 в концентрации 1 и 100 мкМ на спонтанную двигательную активность самцов (а, б) и самок (в, г) *D. melanogaster* с РНК-интерференцией гена *tefu*. # –  $p < 0.003$  относительно родительской линии *da-GAL4* (а, в) и *UAS-RNAi-tefu* (б, г), пост-хок тест Тьюки. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего.

**Таблица 9.** Результаты трехфакторного дисперсионного анализа ANOVA эффектов возраста и обработки ингибитором

| Фактор                        | Пол | SS       | DF  | MS      | F      | <i>p</i> |
|-------------------------------|-----|----------|-----|---------|--------|----------|
| Возраст                       | ♂   | 64852440 | 8   | 8106555 | 34.34  | 0.0000   |
| Обработка                     |     | 479642   | 2   | 239821  | 1.02   | 0.3646   |
| Генотип                       |     | 7080886  | 2   | 3540443 | 15.00  | 0.0000   |
| Возраст × Обработка           |     | 11963427 | 16  | 747714  | 3.17   | 0.0001   |
| Возраст × Генотип             |     | 13373240 | 16  | 835828  | 3.54   | 0.0000   |
| Обработка × Генотип           |     | 1881983  | 4   | 470496  | 1.99   | 0.0986   |
| Возраст × Обработка × Генотип |     | 12077505 | 32  | 377422  | 1.60   | 0.0334   |
| Ошибка                        |     | 33989977 | 144 | 236042  |        |          |
| Возраст                       | ♀   | 2112091  | 8   | 264011  | 6.11   | 0.0000   |
| Обработка                     |     | 159645   | 2   | 79823   | 1.85   | 0.1607   |
| Генотип                       |     | 9592265  | 2   | 4796133 | 111.07 | 0.0000   |
| Возраст × Обработка           |     | 860678   | 16  | 53792   | 1.25   | 0.2385   |
| Возраст × Генотип             |     | 8277206  | 16  | 517325  | 11.98  | 0.0000   |

Таблица 9. Окончание

| Фактор                        | Пол | SS      | DF  | MS     | F    | p      |
|-------------------------------|-----|---------|-----|--------|------|--------|
| Обработка × Генотип           |     | 545528  | 4   | 136382 | 3.16 | 0.0156 |
| Возраст × Обработка × Генотип |     | 2435376 | 32  | 76106  | 1.76 | 0.0118 |
| Ошибка                        |     | 7254654 | 168 | 43182  |      |        |

Примечание. ♂ – самцы, ♀ – самки. SS – сумма квадратов отклонений, DF – число степеней свободы, MS – дисперсия, F – фактическое значение отношения Фишера, p – уровень значимости.

процессов, связанных со старением, включая аутофагию, пролиферацию, дифференцировку, поддержание гомеостаза и выживание клеток, подавление которых может модифицировать геропротекторные эффекты, связанные с ингибированием АТМ.

Наряду с фармакологическим подавлением активности АТМ, супрессия активности гена *tefu* с помощью РНК-интерференции также приводила к увеличению ПЖ экспериментальных особей по сравнению с особями контрольных родительских линий, что подтверждает геропротекторный потенциал АТМ как мишени.

Дальнейшие исследования позволят понять, какие молекулярные процессы лежат в основе эффектов обработки ингибитором АТМ на ПЖ *Drosophila* и как эти эффекты могут различаться у разных видов. Это может привести к разработке более эффективных стратегий увеличения ПЖ и борьбы со старением.

Авторы выражают благодарность Институту биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН за предоставленную коллекцию лабораторных линий плодовых мушек *Drosophila*.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме “Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*” № 122040600022-1.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abraham R.T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **15**, 2177–2196.
2. Paull T.T. (2015) Mechanisms of ATM activation. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 711–738.
3. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R., 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. **316**, 1160–1166.
4. Shibata A., Jeggo P.A. (2021) ATM's role in the repair of DNA double-strand breaks. *Genes*. **12**(9), 1370.
5. Zhang X., Wan G., Berger F.G., He X., Lu X. (2011) The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol. Cell*. **41**, 371–383.
6. Liu J., Jin T., Ran L., Zhao Z., Zhu R., Xie G., Bi X. (2022) Profiling ATM regulated genes in *Drosophila* at physiological condition and after ionizing radiation. *Hereditas*. **159**, 41.
7. Rothblum-Oviatt C., Wright J., Lefton-Greif M.A., McGrath-Morrow S.A., Crawford T.O., Lederman H.M. (2016) Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet. J. Rare Dis.* **11**, 159.
8. Chaudhary M.W., Al-Baradie R.S. (2014) Ataxia-telangiectasia: future prospects. *Appl. Clin. Genet.* **7**, 159–167.
9. Barlow C., Hirotsume S., Paylor R., Liyanage M., Eckhaus M., Collins F., Shiloh Y., Crawley J.N., Ried T., Tagle D., Wynshaw-Boris A. (1996) *Atm*-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. **86**, 159–171.
10. Quek H., Luff J., Cheung K., Kozlov S., Gatei M., Lee C.S., Bellingham M.C., Noakes P.G., Lim Y.C., Barnett N.L., Dingwall S., Wolvetang E., Mashimo T., Roberts T.L., Lavin M.F. (2017) A rat model of ataxia-telangiectasia: evidence for a neurodegenerative phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 109–123.
11. Chen K., Wang P., Chen J., Ying Y., Chen Y., Gilson E., Lu Y., Ye J. (2022) Loss of *atm* in zebrafish as a model of ataxia-telangiectasia syndrome. *Biomedicine*. **10**(2), 392.
12. Petersen A.J., Rimkus S.A., Wassarman D.A. (2012) ATM kinase inhibition in glial cells activates the innate immune response and causes neurodegeneration in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, E656–664.
13. Petersen A.J., Katzenberger R.J., Wassarman D.A. (2013) The innate immune response transcription factor relish is necessary for neurodegeneration in a *Drosophila* model of ataxia-telangiectasia. *Genetics*. **194**, 133–142.
14. Silva E., Tiong S., Pedersen M., Homola E., Royou A., Fasulo B., Siriaco G., Campbell S.D. (2004) ATM is required for telomere maintenance and

- chromosome stability during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* **14**, 1341–1347.
15. Chen T., Dong B., Lu Z., Tian B., Zhang J., Zhou J., Wu H., Zhang Y., Wu J., Lin P., Zhang J., Xu H., Mo X. (2010) A functional single nucleotide polymorphism in promoter of ATM is associated with longevity. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 636–640.
  16. Piaceri I., Bagnoli S., Tedde A., Sorbi S., Nacmias B. (2013) Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) genetic variant in Italian centenarians. *Neurol. Sci.* **34**, 573–575.
  17. Fu S., Hu J., Chen X., Li B., Shun H., Deng J., Zhang Y., Yao Y., Zhao Y. (2021) Mutant single nucleotide polymorphism rs189037 in ataxia-telangiectasia mutated gene is significantly associated with ventricular wall thickness and human lifespan. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 658908.
  18. Ditch S., Paull T.T. (2012) The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 15–22.
  19. Amirifar P., Ranjouri M.R., Yazdani R., Abolhasani H., Aghamohammadi A. (2019) Ataxia-telangiectasia: a review of clinical features and molecular pathology. *Pediatr. Allergy Immunol.* **30**, 277–288.
  20. Valentin-Vega Y.A., Maclean K.H., Tait-Mulder J., Milasta S., Steeves M., Dorsey F.C., Cleveland J.L., Green D.R., Kastan M.B. (2012) Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood.* **119**, 1490–1500.
  21. Hirozane T., Tohmonda T., Yoda M., Shimoda M., Kanai Y., Matsumoto M., Morioka H., Nakamura M., Horiuchi K. (2016) Conditional abrogation of Atm in osteoclasts extends osteoclast lifespan and results in reduced bone mass. *Sci. Rep.* **6**, 34426.
  22. Weiering T.J., Takada S., Weemaes C.M.R., van Schouwenburg P.A., van der Burg M. (2021) ATM: Translating the DNA damage response to adaptive immunity. *Trends Immunol.* **42**, 350–365.
  23. Stagni V., Cirotti C., Barilà D. (2018) Ataxia-telangiectasia mutated kinase in the control of oxidative stress, mitochondria, and autophagy in cancer: a maestro with a large orchestra. *Front. Oncol.* **8**, 73.
  24. Stagni V., Ferri A., Cirotti C., Barilà D. (2020) ATM kinase-dependent regulation of autophagy: a key player in senescence? *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 599048.
  25. Osorio F.G., Barcena C., Soria-Valles C., Ramsay A.J., de Carlos F., Cobo J., Fueyo A., Freije J.M., Lopez-Otin C. (2012) Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.* **26**, 2311–2324.
  26. Lee S.S., Bohrsen C., Pike A.M., Wheelan S.J., Greider C.W. (2015) ATM kinase is required for telomere elongation in mouse and human cells. *Cell Rep.* **13**, 1623–1632.
  27. Kang H.T., Park J.T., Choi K., Kim Y., Choi H.J.C., Jung C.W., Lee Y.S., Park S.C. (2017) Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 616–623.
  28. Kuk M.U., Kim J.W., Lee Y.S., Cho K.A., Park J.T., Park S.C. (2019) Alleviation of senescence via ATM inhibition in accelerated aging models. *Mol. Cells.* **42**, 210–217.
  29. Hari K.L., Santerre A., Sekelsky J.J., McKim K.S., Boyd J.B., Hawley R.S. (1995) The mei-41 gene of *D. melanogaster* is a structural and functional homolog of the human ataxia telangiectasia gene. *Cell.* **82**, 815–821.
  30. Bi X., Srikanta D., Fanti L., Pimpinelli S., Badugu R., Kellum R., Rong Y.S. (2005) *Drosophila* ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 15167–15172.
  31. Pedersen M., Tjong S., Campbell S.D. (2010) Molecular genetic characterization of *Drosophila* ATM conserved functional domains. *Genome.* **53**, 778–786.
  32. Oikemus S.R., McGinnis N., Queiroz-Machado J., Tukachinsky H., Takada S., Sunkel C.E., Brodsky M.H. (2004) *Drosophila atm/telomere fusion* is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes Dev.* **18**, 1850–1861.
  33. Hu Y., Comjean A., Rodiger J., Liu Y., Gao Y., Chung V., Zirin J., Perrimon N., Mohr S.E. (2021) FlyRNAi.org-the database of the *Drosophila* RNAi screening center and transgenic RNAi project: 2021 update. *Nucl. Acids Res.* **49**, D908–D915.
  34. Xia B., de Belle J.S. (2016) Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila*. *Aging.* **8**, 1115–1134.
  35. Shaposhnikov M.V., Zemskaya N.V., Koval L.A., Schegoleva E.V., Zhavoronkov A., Moskalev A.A. (2018) Effects of N-acetyl-L-cysteine on lifespan, locomotor activity and stress-resistance of 3 *Drosophila* species with different lifespans. *Aging.* **10**, 2428–2458.
  36. Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Zemskaya N.V., Koval L., Schegoleva E.V., Guvatova Z.G., Krasnov G.S., Solovov I.A., Sheptyakov M.A., Zhavoronkov A., Kudryavtseva A.V. (2019) Transcriptome analysis of long-lived *Drosophila melanogaster* *E(z)* mutants sheds light on the molecular mechanisms of longevity. *Sci. Rep.* **9**, 9151.
  37. Mantel N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 163–170.
  38. Martinez R.L.M.C., Naranjo J.D. (2012) A pretest for choosing between logrank and wilcoxon tests in the two-sample problem. *Metron.* **68**, 111–125.
  39. Wang C., Li Q., Redden D.T., Weindrich R., Allison D.B. (2004) Statistical methods for testing effects on “maximum lifespan”. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 629–632.
  40. Bland J.M., Altman D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ.* **310**, 170.
  41. McHugh M.L. (2011) Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem. Med.* **21**, 203–209.
  42. Han S.K., Kwon H.C., Yang J.S., Kim S., Lee S.V. (2024) OASIS portable: user-friendly offline suite for secure survival analysis. *Mol Cells.* **47**, 100011.
  43. Toledo-Sherman L., Breccia P., Cachepe R., Bate J.R., Angulo-Herrera I., Wishart G., Matthews K.L.,

- Martin S.L., Cox H.C., McAllister G., Penrose S.D., Vater H., Esmieu W., Van de Poël A., Van de Bospoort R., Strijbosch A., Lamers M., Leonard P., Jarvis R.E., Blackaby W., Barnes K., Eznarriaga M., Dowler S., Smith G.D., Fischer D.F., Lazari O., Yates D., Rose M., Jang S.W., Muñoz-Sanjuan I., Dominguez C. (2019) Optimization of potent and selective ataxia telangiectasia-mutated inhibitors suitable for a proof-of-concept study in Huntington's disease models. *J. Med. Chem.* **62**, 2988–3008.
44. Moskalev A., Chernyagina E., Kudryavtseva A., Shaposhnikov M. (2017) Geroprotectors: a unified concept and screening approaches. *Aging Dis.* **8**, 354–363.
  45. Земская Н.В., Шапошников М.В., Москалев А.А. (2017) Взаимосвязь продолжительности жизни с характеристиками жизненного цикла и стрессоустойчивостью у 12 видов рода *Drosophila*. Успехи геронтологии. **30**, 192–199.
  46. Maslov D.L., Zemskaya N.V., Trifonova O.P., Lichtenberg S., Balashova E.E., Lisitsa A.V., Moskalev A.A., Lokhov P.G. (2021) Comparative metabolomic study of *Drosophila* species with different lifespans. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12873.
  47. Ma S., Avanesov A.S., Porter E., Lee B.C., Mariotti M., Zemskaya N., Guigo R., Moskalev A.A., Gladyshev V.N. (2018) Comparative transcriptomics across 14 *Drosophila* species reveals signatures of longevity. *Aging Cell.* **17**, e12740.
  48. Lushchak O., Strilbytska O., Storey K.B. (2023) Gender-specific effects of pro-longevity interventions in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **209**, 111754.
  49. Zhu Y., Mao C., Wu J., Li S., Ma R., Cao H., Ji M., Jing C., Tang J. (2014) Improved ataxia telangiectasia mutated kinase inhibitor KU60019 provides a promising treatment strategy for non-invasive breast cancer. *Oncol. Lett.* **8**, 2043–2048.
  50. Cao W., Shen R., Richard S., Liu Y., Jalalirad M., Cleary M.P., D'Assoro A.B., Gradilone S.A., Yang D.Q. (2022) Inhibition of triple-negative breast cancer proliferation and motility by reactivating p53 and inhibiting overactivated Akt. *Oncol. Rep.* **47**(2), 41.
  51. Qian M., Liu Z., Peng L., Tang X., Meng F., Ao Y., Zhou M., Wang M., Cao X., Qin B., Wang Z., Zhou Z., Wang G., Gao Z., Xu J., Liu B. (2018) Boosting ATM activity alleviates aging and extends lifespan in a mouse model of progeria. *eLife.* **7**, e34836.
  52. Lee J.H., Guo Z., Myler L.R., Zheng S., Paull T.T. (2014) Direct activation of ATM by resveratrol under oxidizing conditions. *PLoS One.* **9**, e97969.
  53. Qi Y., Qiu Q., Gu X., Tian Y., Zhang Y. (2016) ATM mediates spermidine-induced mitophagy via PINK1 and Parkin regulation in human fibroblasts. *Sci. Rep.* **6**, 24700.
  54. Kang H.T., Park J.T., Choi K., Kim Y., Choi H.J.C., Jung C.W., Lee Y.S., Park S.C. (2017) Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 616–623.
  55. Cheng A., Tse K.H., Chow H.M., Gan Y., Song X., Ma F., Qian Y.X.Y., She W., Herrup K. (2021) ATM loss disrupts the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy.* **17**, 1998–2010.
  56. Boya P., Kroemer G. (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* **27**, 6434–6451.
  57. Гусакова Е.А., Городецкая И.В. (2012) Стресс и протеолитические ферменты лизосом. Вестник ВГМУ. **11**, 15–25.
  58. Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. (2008) Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 1291–1303.
  59. Pivtoraiko V.N., Stone S.L., Roth K.A., Shacka J.J. (2009) Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 481–496.
  60. Nishikawa H., Miyazaki T., Nakayama H., Mine-matsu A., Yamauchi S., Yamashita K., Takazono T., Shimamura S., Nakamura S., Izumikawa K., Yanagihara K., Kohno S., Mukae H. (2016) Roles of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the oxidative stress response of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* **16**(5), fow054.
  61. Lee C., Lamech L., Johns E., Overholtzer M. (2020) Selective lysosome membrane turnover is induced by nutrient starvation. *Dev. Cell.* **55**, 289–297 e284.
  62. Bandyopadhyay U., Todorova P., Pavlova N.N., Tada Y., Thompson C.B., Finley L.W.S., Overholtzer M. (2022) Leucine retention in lysosomes is regulated by starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119**(6), e2114912119.
  63. Ingemann L., Kirkegaard T. (2014) Lysosomal storage diseases and the heat shock response: convergences and therapeutic opportunities. *J. Lipid. Res.* **55**, 2198–2210.
  64. Nylandsted J., Gyrð-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jaattela M. (2004) Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.* **200**, 425–435.
  65. Milanović Z., Pantelić S., Trajković N., Sporiš G., Kostić R., James N. (2013) Age-related decrease in physical activity and functional fitness among elderly men and women. *Clin. Interv. Aging.* **8**, 549–556.
  66. Buchman A.S., Wilson R.S., Yu L., James B.D., Boyle P.A., Bennett D.A. (2014) Total daily activity declines more rapidly with increasing age in older adults. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **58**, 74–79.
  67. Iliadi K.G., Boulianne G.L. (2010) Age-related behavioral changes in *Drosophila*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1197**, 9–18.
  68. Jones M.A., Grotewiel M. (2011) *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors. *Exp. Gerontol.* **46**, 320–325.
  69. Tower J. (2023) Markers and mechanisms of death in *Drosophila*. *Front Aging.* **4**, 1292040.
  70. Lints F.A., Le Bourg E., Lints C.V. (1984) Spontaneous locomotor activity and life span. A test of the rate of living theory in *Drosophila melanogaster*. *Gerontology.* **30**, 376–387.

71. Le Bourg E. (1987) The rate of living theory. Spontaneous locomotor activity, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **22**, 359–369.
72. Shaposhnikov M.V., Guvatova Z.G., Zemskaya N.V., Koval L.A., Schegoleva E.V., Gorbunova A.A., Golubev D.A., Pakshina N.R., Ulyasheva N.S., Solovev I.A., Bobrovskikh M.A., Gruntenko N.E., Menshanov P.N., Krasnov G.S., Kudryavseva A.V., Moskalev A.A. (2022) Molecular mechanisms of exceptional lifespan increase of *Drosophila melanogaster* with different genotypes after combinations of pro-longevity interventions. *Commun. Biol.* **5**, 566.
73. Mueller J.M., Zhang N., Carlson J.M., Simpson J.H. (2021) Variation and variability in *Drosophila* grooming behavior. *Front. Behav. Neurosci.* **15**, 769372.
74. Bi X., Wei S.C., Rong Y.S. (2004) Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in *Drosophila* telomere maintenance. *Curr. Biol.* **14**, 1348–1353.
75. Bi X., Gong M., Srikanta D., Rong Y.S. (2005) *Drosophila* ATM and Mre11 are essential for the G2/M checkpoint induced by low-dose irradiation. *Genetics*. **171**, 845–847.
76. Ciapponi L., Cenci G., Gatti M. (2006) The *Drosophila* Nbs protein functions in multiple pathways for the maintenance of genome stability. *Genetics*. **173**, 1447–1454.
77. Scoles D.R., Gandelman M., Paul S., Dexheimer T., Dansithong W., Figueroa K.P., Pflieger L.T., Redlin S., Kales S.C., Sun H., Maloney D., Damoiseaux R., Henderson M.J., Simeonov A., Jadhav A., Pulst S.M. (2022) A quantitative high-throughput screen identifies compounds that lower expression of the SCA2-and ALS-associated gene *ATXN2*. *J. Biol. Chem.* **298**, 102228.
78. Patel P.R., Sun H., Li S.Q., Shen M., Khan J., Thomas C.J., Davis M.I. (2013) Identification of potent Yes1 kinase inhibitors using a library screening approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4398–4403.

## Studying the Geroprotective Properties of the ATM Inhibitor KU-60019 on Three *Drosophila* Species with Different Life Span

L. A. Koval<sup>1</sup>, N. V. Zemskaya<sup>1</sup>, N. P. Pakshina<sup>1</sup>, M. V. Shaposhnikov<sup>1</sup>, A. A. Moskalev<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Syktyvkar, 167982 Russia*

\*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

The serine/threonine protein kinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) performs a number of functions in the cell that are interrelated with the aging process. In addition to regulating the cellular response to DNA damage, ATM phosphorylates vacuolar ATPase, leading to lysosome degradation and cellular senescence. In this work, we analysed the geroprotective potential of KU-60019, a selective ATM inhibitor, using individuals of three *Drosophila* species with different lifespans. KU-60019 was shown to increase the lifespan of individuals of the long-lived species *D. virilis* and individuals of a species with moderate lifespan *D. melanogaster*. However, in individuals of the short-lived species *D. kikkawai*, longevity is reduced after KU-60019 treatment. At the same time, KU-60019 treatment increases survival of *Drosophila* individuals of the three species under hyperthermia, oxidative stress and starvation, but has no effect on age-dependent changes in the level of locomotor activity. Suppression of tefu gene expression (ATM homologue) by RNA interference also causes an increase in longevity and stress tolerance of *D. melanogaster* individuals compared to individuals of control lines. Thus, the effect of KU-60019 on longevity varies depending on the *Drosophila* species, which may be related to the previously established differences of transcriptomes in the studied species and requires further experimental study.

**Keywords:** ATM inhibitor, KU-60019, lifespan, stress tolerance, spontaneous activity, *Drosophila*

# ПОИСК ИНСЕРЦИЙ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ И ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК, ВЛИЯЮЩИХ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, В ЛИНИЯХ *D. melanogaster* С НАРУШЕНИЕМ КОНТРОЛЯ ТРАНСПОЗИЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *gypsy*

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

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

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

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

\*e-mail: vladimirova-bph@yandex.ru

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

Поступила в редакцию 11.11.2023 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 02.04.2024 г.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) способствуют повышению частоты спонтанных мутаций в геноме, а также способны изменять структуру генов или влиять на их экспрессию, поэтому важно иметь представление об активности МГЭ и их положении в геноме. В представленной работе показано преимущество сочетания двух методов секвенирования для поиска инсерций МГЭ и хромосомных перестроек: полногеномного нанопорового секвенирования и секвенирования транскриптома методом Illumina. Полногеномное нанопоровое секвенирование позволяет обнаружить инсерции МГЭ, а секвенирование транскриптома на платформе Illumina – оценить влияние инсерций на экспрессию генов. В работе использованы данные секвенирования геномов линий *Drosophila melanogaster* с фенотипом flamenco SS ( $w^l$ , мутант *flamenco*) и MS ( $w^l$ , мутант *flamenco*, активная копия *gypsy*). В качестве контроля использована лабораторная линия дикого типа Д32. В линиях SS, MS и линии дикого типа обнаружены инсерции и делеции МГЭ в эухроматиновых районах генома и в интронах генов относительно референсного генома (NCBI GCF\_000001215.4). В анализируемых геномах проведен поиск инсерций и делеций в генах системы РНК-интерференции и в генах, дифференциально экспрессируемых у мух линий SS и MS. В результате обнаружены инсерции МГЭ в различных регионах генов *AGO3*, *CG17147*, *Su(var)3-3*, *Gasz*, *CG43348*, *moody*, *CG17752*. Не обнаружено корреляции между изменением положения МГЭ и уменьшением или увеличением экспрессии большинства анализируемых генов. В гене *vig* найдена хромосомная перестройка, затрагивающая 3'-нетранслируемую область. На основании результатов секвенирования длинными прочтениями получена сборка генома линии MS *de novo*. Установлено, что повышение экспрессии генов *CR45822* и *pst* в линиях SS и MS связано с трипликацией, а не с изменением регуляторных последовательностей генов или инсерцией МГЭ.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, мобильные генетические элементы, эволюция, Oxford Nanopore, Illumina, сборка генома

DOI: 10.31857/S0026898424050055, EDN: HUPDPY

## ВВЕДЕНИЕ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) являются структурной частью генома эукариот, они составляют значительную его долю и влия-

ют на активность множества генов. События рекомбинации между последовательностями МГЭ приводят к геномным перестройкам, а транспозиция МГЭ в ген – к нарушению его работы [1]. Мутации в генах системы контроля подавления

активности МГЭ приводят к увеличению вероятности транспозиции этих элементов [2].

Известно несколько путей РНК-интерференции, используемых для подавления экспрессии МГЭ на посттранскрипционном уровне, в каждом из которых функционируют разные гены и разные источники антисмысловой РНК [3]. Один из основных механизмов сайленсинга транспозонов в клетках зародышевого пути у дрозофилы — путь piРНК-интерференции [4], в котором piРНК при участии белков PIWI подавляют ретротранспозоны [5, 6]. piРНК это РНК длиной 23–30 нуклеотидов, которые обычно закодированы в специализированных геномных регионах — в кластерах piРНК, обогащенных дефектными последовательностями транспозонов [7]. Нарушение процессов синтеза и сплайсинга транскриптов кластеров снижает разнообразие и общее количество piРНК, что может привести к повышению уровня транскрипции МГЭ [8]. В то же время, в соматических клетках активность МГЭ в основном контролируется эндогенными малыми интерферирующими РНК (endo-siРНК), за формирование которых отвечают белки Dicer-2 (Dcr-2) и Argonaute 2 (AGO2) [9].

Удобным экспериментальным объектом для исследования МГЭ является *Drosophila melanogaster*. Геном дрозофилы содержит несколько десятков описанных и классифицированных семейств МГЭ [10]. Базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [11], FlyBase ([flybase.org](http://flybase.org)) [12], MSTE [13] и другие содержат информацию о геноме *D. melanogaster*, что значительно облегчает поиск повторяющихся последовательностей. Например, в базе FlyBase [12] в референсном геноме (NCBI GCF\_000001215.4) указаны положения полноразмерных копий или фрагментов МГЭ.

Активность МГЭ на уровне транскрипции и биогенез piРНК часто изучают с использованием высокопроизводительного секвенирования. Описаны изменения транскрипционной активности МГЭ при стрессе (температурные факторы, радиация и т.д.) или нарушении работы системы РНК-интерференции [14, 15].

С целью поиска новых положений МГЭ в геноме используют секвенирование длинными прочтениями [16, 17]. К недостаткам секвенирования длинными прочтениями методом Oxford Nanopore относится высокая частота ошибок (5–15%) [18], но это не влияет на определение положения МГЭ и крупных хромосомных перестроек. Для выравнивания прочтений, полученных методом нанопорового секвенирования, с исследуемым геномом, используют такие программы, как BWA-MEM [19],

Minimap2 [20], NGMLR [21] и другие [22–24]. Несмотря на то, что программа BWA-MEM рекомендована для работы с длинными прочтениями, она неточно определяет границы структурных вариаций (Structural variations (SVs)) [20]. Одна из наиболее простых, быстрых и эффективных программ при работе с длинными прочтениями — программа Minimap2, эффективная в случае последовательностей длиной до ~100 млн п.н. [20].

В свою очередь, сопоставление *de novo* сборки исследуемого генома и транскриптома позволяет провести корреляционный анализ изменения экспрессии генов, вблизи которых произошла инсерция МГЭ [16].

Ранее в работах нашей лаборатории было показано нарушение процессов сплайсинга транскриптов локуса *flamenco* у линий SS и MS [25], что может быть причиной нарушения контроля активности МГЭ (фенотип flamenco). Линии SS и MS характеризуются генетической нестабильностью, которую связывают с присутствием мутантного аллеля *flamenco* [26]. Линия MS получена путем введения в линию SS активной копии ретротранспозона с длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозона) *gypsy* [27]. Линия MS характеризуется повышенной экспрессией *gypsy*, снижением репродуктивных способностей самок, связанным с комплексными нарушениями морфологии яичников, а также снижением экспрессии генов, ответственных за формирование яйца [26, 27]. Анализ транскриптома линий SS и MS не выявил значимых мутаций в экзонах генов системы РНК-интерференции. Обнаруженные изменения экспрессии генов не объясняли природу фенотипа *flamenco* [28]. Можно предположить, что в исследуемых линиях эти изменения связаны с мутациями в регуляторных районах генов или с инсерциями МГЭ, которые невозможно обнаружить секвенированием транскриптома короткими прочтениями.

В ходе исследования сравнили данные секвенирования длинными прочтениями генома *D. melanogaster* линий SS, MS, линии дикого типа Д32 с референсным геномом. Проведена сборка генома MS и осуществлен поиск генетических перестроек, которые могли повлиять на изменение экспрессии генов. Описаны подходы, позволяющие избежать ошибок, вызванных несовершенством стандартных способов обработки данных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Линии *D. melanogaster* и условия культивирования.** В работе использовали изогенные линии с фенотипом flamenco SS ( $w^1$ ) и MS ( $w^1$ , *forked*, содержит искусственно внесен-

ный МГЭ *gypsy*) [27], и линию дикого типа Д32 из коллекции кафедры генетики МГУ. Мух культивировали в стандартных условиях: на пищевом субстрате (агар, манная крупа, сахар, изюм, дрожжи) в стеклянных пробирках при температуре 25°C и влажности около 65%. Мух пересаживали на свежий корм в новую пробирку каждые 18 дней.

**Выделение РНК и высокопроизводительное секвенирование.** РНК выделяли из пяти самок линий SS, MS и Д32 с помощью комплекта реактивов ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit (“Thermo Scientific”, США), целостность (RIN>7) оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (“Agilent”, США). Подготовка библиотек выполнена с использованием набора TruSeq RNA Library Prep Kit v.2 (“Illumina”, США). Перед секвенированием концентрацию библиотек оценивали с помощью флуориметра Qubit и ПЦР в реальном времени (праймеры: I-qPCR-1.1 AATGATACGGCGACCACCGAGAT и I-qPCR-2.1 CAAGCAGAAGACGGCATACGA). Библиотеки были разведены до концентрации 11 пМ и секвенированы на приборе Illumina HiSeq 2000 (длина прочтения – 50 нуклеотидов). Глубина секвенирования в случае линии MS составила 5 млн прочтений, линий Д32 и SS – 12 млн прочтений на образец. Качество секвенирования контролировали с помощью программы FastQC [29]. Для тримминга секвенированных последовательностей использовали программу Trimmomatic v.0.32 [30]. Доля прочтений с качеством не менее 20 (по системе оценки качества PHRED) составила 98.9–99.5%. Короткие прочтения были сопоставлены с референсным геномом *D. melanogaster* сборки BDGP6 (версия BDGP6.94) с использованием программы Tophat v.2.1.0 [31]. Доля картированных прочтений составила 94–98%. Подсчет прочтений производили с помощью программы HTSeq v.0.6.1 [32].

Дифференциальную экспрессию генов оценивали методом DESeq [33]. Транскриптомные линии SS, MS и Д32 (контрольная линия) сравнивали попарно. Выявленные дифференциально экспрессируемые гены ( $p_{adj}<0.05$ ) в линии SS дополнительно валидировали путем сравнения транскриптома линии SS с линиями Oregon-R и w<sup>1118</sup> (глубина секвенирования 11–17 млн прочтений на образец, серии экспериментов GSE99574), которые доступны в NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) и процессированы согласно описанному выше протоколу [26, 28].

**Выделение ДНК и нанопоровое секвенирование.** Для выделения геномной ДНК использовали по восемь самок линий MS,

SS, Д32. Мух гомогенизировали тefлоновым пестиком в микропробирке. Затем добавляли 500 мкл лизирующего раствора (0.1 М Трис-НСl pH 9.0, 0.1 М EDTA, 1% SDS, 1% DEPC) и инкубировали в течение 30 мин при 70°C. ДНК из раствора осаждали ацетатом калия (1 М) и изопропанолом (0.5 объема). После промывки 70%-ным этанолом осадок ДНК растворяли в деионизированной воде. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Peglab). Образцы ДНК были обработаны РНКазой А (“Thermo Scientific”). Соотношения оптической плотности при 260/280 и 260/230 нм составляли более 2.1. Подготовку библиотеки для нанопорового секвенирования проводили с использованием набора Ligation Sequencing kit (“Oxford Nanopore Technologies”, Великобритания). Библиотеки секвенировали на приборе MinION (ячейка FLO-MIN106D). Итоговое количество прочтений составило  $2.6 \times 10^6$  при среднем размере прочтения 3800 п.н. Максимальная длина прочтения – около 48000 п.н. Общее количество прочитанных нуклеотидов  $6.7 \times 10^9$  п.н. Процедуру “бейс-коллинга” проводили с помощью программного пакета Guppy. Прочтения выравнивали на геном *D. melanogaster* сборки BDGP6 (версия BDGP6.94) с помощью программы Minimap2 [20]. Получено 20-кратное значение покрытия генома линии MS. В случае линий SS и Д32 покрытие было 5–7-кратным. Последующую сборку генома *de novo* выполняли с помощью программы Canu с параметрами по умолчанию [34]. Полученные контиги картировали на геном *D. melanogaster* сборки BDGP6 с помощью программы Minimap2 [20]. Покрытие контигов относительно референсного генома не менее 65%.

**Дополнительные программы.** Для визуализации прочтений использовали программу IGV [35]. Программа визуализирует выровненные прочтения на референсный геном с указанием границ генов. Цветовая палитра, предусмотренная программным продуктом IGV, позволяет увидеть замены нуклеотидов, делеции и вставки с указанием размера в парах нуклеотидов (п.н.). Секвенирование длинными прочтениями не позволяет определить положение МГЭ с точностью до нуклеотида в связи с высокой ошибкой секвенирования [18]. В данной работе рассмотрены хромосомные перестройки, инсерции и делеции МГЭ, обнаруженные в гомозиготном состоянии, так как только они могут быть характеристикой линии.

**Количественная ОТ-ПЦР.** Различия в экспрессии отдельных генов подтверждали с помощью количественной ПЦР на матрице кДНК. Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (“Thermo Scientific”). Обратную транскрип-

цию проводили с использованием случайного праймера по протоколу набора MMLV-RT Kit (“Евроген”, Россия). Амплификацию проводили в амплификаторе Mini-Opticon Real-Time-PCR System (“Bio-Rad Lab”, США) с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”), содержащей флуоресцентный краситель SYBR Green I. Параметры амплификации: предварительная денатурация – 95°C, 5 мин, затем 40 циклов ПЦР (денатурация – 95°C, 15 с, отжиг праймеров – 55°C, 45 с, элонгация – 72°C, 60 с). Эффективность праймеров оценивали с помощью серии кратных разведений ДНК или кДНК. Результаты ПЦР анализировали с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). В качестве референсных использовали гены *αTub84D*, *RpL40*, *EloB*, *eIF-1A*. Уровень экспрессии генов рассчитывали по методу  $\Delta C_t$  (уровень экспрессии гена интереса) =  $2^{C_{t[\text{среднее арифметическое референсных генов}] - C_{t[\text{ген интереса}]}}$  на матрице кДНК. Количество копий гена в геноме рассчитывали по методу  $\Delta C_t$  (количество копий гена интереса) =  $2^{C_{t[\text{референсный ген}] - C_{t[\text{ген интереса}]}}$  на матрице ДНК. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск МГЭ и хромосомных перестроек на основании данных секвенирования генома длинными прочтениями и транскриптома

В анализе использованы данные нанопорового секвенирования генома и секвенирования транскриптома методом Illumina изогенных линий SS и MS *D. melanogaster* с нарушенным контролем транспозиции МГЭ *gypsy*. В качестве контроля использованы линия дикого типа Д32 и референсный геном. Мух содержали в одинаковых стандартных условиях на протяжении долгого времени. Таким образом при анализе транскриптома исключается влияние стресса и условий содержания на экспрессию генов. Секвенирование генома длинными прочтениями позволяет увидеть хромосомные перестройки и новые инсерции МГЭ в изогенных линиях, а секвенирование транс-

криптома позволяет оценить дифференциальную экспрессию генов.

Результаты секвенирования длинными прочтениями анализировали с использованием программы Minimap2. Мы обратили внимание, что Minimap2 по-разному интерпретирует данные прочтений с гибридной структурой. Прочтениями с гибридной структурой мы называем прочтения, состоящие из последовательности МГЭ и геномного окружения инсерции.

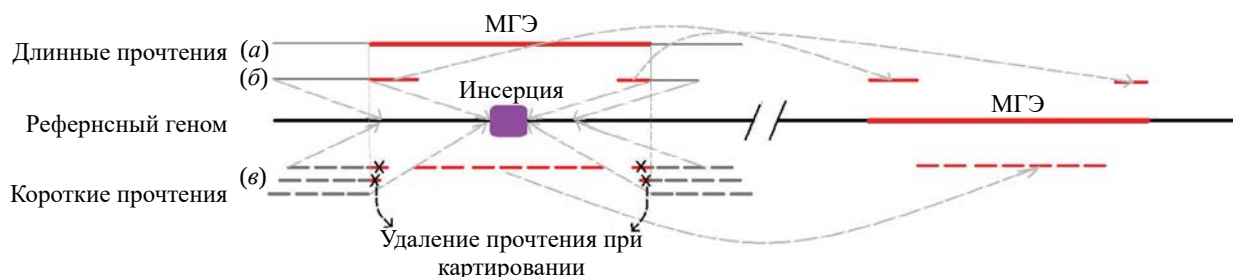
При выравнивании на референсный геном прочтения с гибридной структурой, включающего последовательность МГЭ с геномным окружением (последовательность генома + МГЭ + последовательность генома) (рис. 1а), программа Minimap2 будет интерпретировать данные как новую инсерцию. Если гибридное прочтение начинается или заканчивается последовательностью МГЭ, которой нет в референсном геноме в данном положении (последовательность генома + начало/конец МГЭ) (рис. 1б), то Minimap2 разделяет прочтение на два положения в геноме: один фрагмент прочтения будет сопоставлен с соответствующим участком референсного генома, а другой, содержащий фрагмент МГЭ, будет ошибочно картирован в случайную последовательность этого МГЭ в референсном геноме. Таким образом, у гомозиготы по инсерции МГЭ будет показана инсерция или набор прочтений, обрывающихся в области инсерции. У гетерозиготы мы можем наблюдать прочтения без инсерции, прочтения с инсерцией (при хорошем покрытии) и набор прочтений, обрывающихся в области инсерции.

Единственное, что позволяет предположить факт некорректного выравнивания, это увеличение покрытия для МГЭ в референсном геноме в 2–5 раз. По анализу прочтений в районе МГЭ в референсном геноме можно установить координаты расположения других фрагментов прочтения, содержащих участок генома, и тем самым установить локализацию инсерции МГЭ.

В анализе транскриптома методом Illumina использовали программу Tophat. Короткие прочтения не могут иметь гибридную струк-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для ОТ-ПЦР

| Ген            | Прямой праймер (5'-3') | Обратный праймер (5'-3') | Ампликон, п.н. |
|----------------|------------------------|--------------------------|----------------|
| <i>CR45822</i> | GTTCCGTGGTCAGTACAGC    | GTCGAGCAAGTGATACAAATG    | 81             |
| <i>αTub84D</i> | GTGCATGTTGTCCAACACCAC  | AGAACTCTCCCTCCTCCATA     | 131            |
| <i>RpL40</i>   | CTGCGTGGTGGTATCATTG    | CAGGTTGTTGGTGTGTCC       | 147            |
| <i>EloB</i>    | GCACAAACATACACACTCACG  | TTTCCTACTTCGCTTGACCC     | 142            |
| <i>eIF-1A</i>  | TCGCTGGAGGCAATGTG      | GAGTCCTGGTAGTCACGC       | 126            |
| <i>forked</i>  | GGATACGGAGGACTACATGC   | GTGTGGCTTCTGGGCTTGT      | 265            |



**Рис. 1.** Схема сопоставления прочтений с референсным геномом, включающих последовательность МГЭ, для секвенирования длинными прочтениями и секвенирования короткими прочтениями. Красным цветом изображен МГЭ в исследуемом геноме, черным — референсный геном с указанием положения инсертсии (фиолетовый). При выравнивании длинных прочтений, включающих последовательность МГЭ, окруженную последовательностями генома, данные будут интерпретированы как новая инсертсия (а). Короткие фрагменты МГЭ будут ошибочно перенесены в случайную последовательность этого МГЭ в референсном геноме (б, в).

туру “последовательность генома + МГЭ + последовательность генома”, так как инсертции МГЭ или его фрагментов чаще всего имеют размер более 300 п.н., что больше размера короткого прочтения (рис. 1в). При структуре короткого прочтения “последовательность генома + начало/конец МГЭ” программа для сопоставления прочтений с референсным геномом не будет использовать при выравнивании такие прочтения из-за превышения параметра несовпадающих нуклеотидов.

#### *Верификация инсертции ретротранспозона gypsy в ген forked линии MS D. melanogaster*

В анализе использовали линию MS с инсертцией ретротранспозона gypsy в ген *forked*. В начале исследования точное положение данной инсертции было неизвестно. Анализ секвенирования генома линии MS *D. melanogaster* длинными прочтениями подтвердил инсертцию ретротранспозона gypsy размером около 7450 п.н. (рис. S1, анализ последовательности S1, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Kukushkina\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Kukushkina_rus.pdf)) в ген *forked*.

Зная точное положение инсертции МГЭ, можно подтвердить мутацию методом ПЦР с использованием ДНК как матрицы. Праймеры при этом подбирают в окружении и внутри МГЭ [36]. Для подтверждения инсертции использовали отводку линии MS, прошедшую через насыщающее скрещивание, чтобы исключить возможную гетерогенность линии по инсертции gypsy в *forked*. Ретротранспозон gypsy относится к классу ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозон), он содержит два однонаправленных ДКП размером 482 п.н. Для подтверждения инсертции использовали праймеры в окружении МГЭ согласно [36].

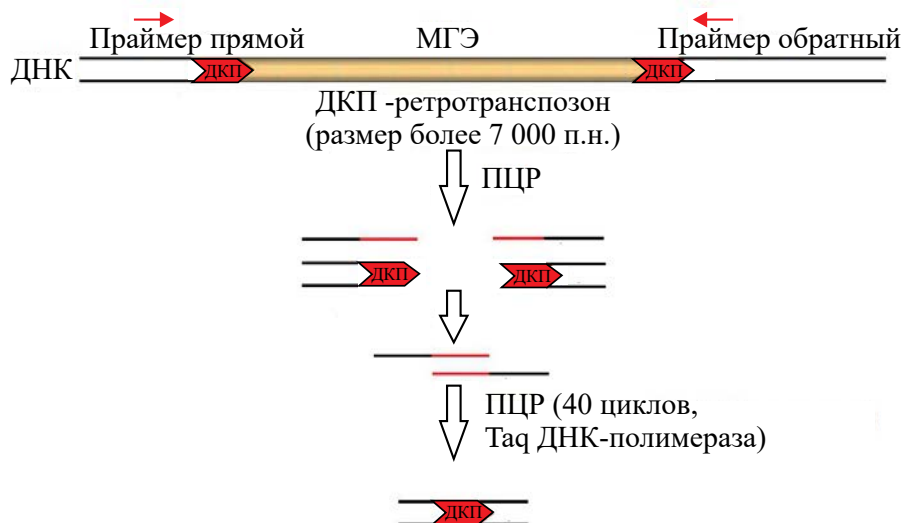
Так как размер МГЭ составляет более 7 т.п.н., а время элонгации равно 60 с, то ПЦР-продукт не должен синтезироваться. При этом праймеры на ген *forked* без инсертций должны амплифицировать один продукт размером 265 п.н.

Однако в результате ПЦР на геномной ДНК линии MS с соответствующими праймерами вокруг инсертции МГЭ получен продукт размером около 750 п.н., который далее был секвенирован по методу Сэнгера (анализ последовательности S2, см. электронное приложение). Обнаруженный фрагмент 750 п.н. соответствовал участку гена *forked* со вставкой фрагмента МГЭ gypsy размером 481 п.н. При этом последовательность инсертции совпадала по размерам с ДКП МГЭ (482 п.н.). Такой ПЦР-фрагмент мог получиться аналогично процессам, происходящим при ПЦР для сайт-направленного мутагенеза [37] (рис. 2).

Таким образом, при подтверждении инсертций методом ПЦР следует учитывать возможность ложноотрицательного результата, если МГЭ относится к классу ДКП-ретротранспозонов. Такие МГЭ с обоих концов фланкированы длинными прямыми повторами, которые могут отжигаться друг на друга за счет взаимной комплементарности во время ПЦР.

#### *Поиск хромосомных перестроек в генах системы рiРНК-интерференции и в дифференциально экспрессируемых генах*

Инсертции и делеции МГЭ являются характеристикой линий с нарушением контроля транспозиции [38–40]. В связи со значительным количеством генетических перестроек, обнаруженных при поиске ассоциаций с фенотипом flamenco, мы решили остановиться на анализе инсертций и делеций в генах системы рiРНК-интерференции и генах, дифференциально экспрессируемых в линиях SS и MS [26, 28].



**Рис. 2.** Схема амплификации ДКП ДКП-ретротранспозонов, имеющих в своей структуре два сопоставленных ДКП. В ходе ПЦР синтезируются продукты, содержащие на 3'-концах два гомологичных и сопоставленных ДКП. Достаивание фрагмента происходит за счет перекрытия гомологичных участков.

Анализ последовательностей и промоторных областей 74 генов системы *pi*РНК-интерференции [41] и 65 генов, дифференциально экспрессируемых в линиях SS и MS [26, 28], позволил обнаружить инсерции МГЭ или другие перестройки генома, которые могут нарушать работу гена (табл. 2).

В табл. 3 представлены результаты определения дифференциальной экспрессии генов в линиях SS и MS с фенотипом *flamenco* относительно линии Д32 ( $p_{adj} \leq 0.05$ ), содержащие инсерции/делеции МГЭ или другие перестройки генома. Гены из таблицы 2 с  $p_{adj} > 0.05$  не приведены.

Один из основных белков *pi*РНК-интерференции — Argonaute 3 (AGO3). В экзонах гена *AGO3* мутаций не обнаружено, но в отличие от референсного генома интроны данного гена в анализируемых линиях содержат несколько инсерций МГЭ. Линии SS, MS и Д32 имеют свой уникальный набор МГЭ. Инсерции МГЭ X и G4 представлены в линиях SS и MS, а также в линии дикого типа Д32 (рис. 3а, табл. 2). Ген *AGO3* находится на границе с кластером *80F*, что может характеризовать данный район как горячую точку транспозиции МГЭ. Аналогичные инсерции обнаружены и в линии дикого типа, поэтому можно сделать вывод, что эти мутации не ассоциированы с фенотипом *flamenco*.

В линиях SS и MS (2L: 15064123) найдена инсерция около 2250 п.н. в интроне гена *vasa* (*vas*) (табл. 2). Анализ этой инсерции показал, что это не МГЭ, а дупликация фрагмента интрона данного гена (2L: 15061758–15064119). Эта дупликация в гене *vasa* затрагивает 3'-не-

транслируемую область транскриптов *vig-Rd* и *vigRB* гена *vig*, расположенного на противоположной цепи ДНК относительно гена *vasa*. Мутация в 3'-нетранслируемой области может нарушать экспрессию гена на уровне белка. *VIG* участвует в организации гетерохроматина и его положение частично перекрывается с *HP1*. Мутанты по гену *vig* демонстрируют истощение *HP1* и *HP2* в изолированных ядрах [42]. Ранее в линиях SS и MS обнаружили снижение уровня экспрессии гена *rhino* (*hpld*), который кодирует белок из семейства *HP1* [25].

*Vasa* (*Vas*) играет решающую роль в широком спектре клеточных процессов, включая биогенез рибосом [43, 44], инициацию трансляции [45], развитие ооцита [46, 47], сплайсинг пре-мРНК и распад мРНК [44]. Мутации в гене *vasa* обычно приводят к частичной или полной стерильности, а также к повышению экспрессии МГЭ [41, 46, 47]. Так как дупликация в интроне гена *vasa* обнаружена в линиях SS и MS, можно предположить, что мутация не приводит к нарушению репродуктивных способностей самок [26]. При этом анализ транскриптомных данных не подтвердил появления нового экзона или изменения транскрипции гена [28].

В линии MS обнаружена инсерция МГЭ в гене *Gasz* (табл. 2). *Gasz* кодирует фактор первичного биогенеза *pi*РНК. Инсерция ретротранспозона 17,6 в 3'-нетранслируемой области может нарушать экспрессию гена на уровне белка. *Gasz* локализуется на внешней мембране митохондрий вместе с *Daed* и *Zuc* и участвует в созревании *pi*РНК на поверхности митохондрий. Истощение *Gasz* приводит к накопле-

**Таблица 2.** Мутации в генах рiРНК-интерференции и генах, дифференциально экспрессируемых в линиях SS, MS и линии дикого типа Д32

| Ген                             | Положение инделов, п.н.** | Положение, инсерция/делеция и размер, п.н.** |                            |       | МГЭ                                                                | MS | SS | Д32 |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------|----|----|-----|
| <i>AGO3*</i>                    | 3L: 23572954              | Интрон                                       | Инсерция                   | 5050  | <i>BS</i>                                                          |    | +  |     |
|                                 | 3L: 23610908              | То же                                        | То же                      | 4700  | <i>Doc</i>                                                         |    |    | +   |
|                                 | 3L: 23618761              | —//—                                         | —//—                       | 910   | <i>roo</i>                                                         |    | +  |     |
|                                 | 3L: 23610908–<br>23620600 | —//—                                         | Делеция<br>(гетерозигота)  | 9700  | —                                                                  |    |    | +   |
|                                 | 3L: 23663464              | —//—                                         | Инсерция<br>(гетерозигота) | 6150  | <i>X</i>                                                           | +  | +  | +   |
|                                 | 3L: 23684000              | —//—                                         | Инсерция<br>(гетерозигота) | 2050  | <i>G4</i>                                                          | +  |    | +   |
| <i>vasa*/vig*</i>               | 2L: 15064123              | —//—                                         | Инсерция                   | 2350  | Дубликация<br>района гена <i>vasa</i><br>2L: 15061758–<br>15064019 | +  | +  |     |
| <i>Su(var)3-3*/<br/>CG17147</i> | 3L: 20225800              |                                              | То же                      | 7400  | <i>blood</i>                                                       | +  | +  |     |
| <i>Gasz*</i>                    | 2R: 8170000               | 3'-Нетранслируемая<br>область                | —//—                       | 6700  | <i>17.6</i>                                                        | +  |    |     |
| <i>CG43348</i>                  | 2L: 1199692               | 3'-Нетранслируемая<br>область                | —//—                       | 9700  | <i>Max</i>                                                         | +  |    |     |
| <i>moody</i>                    | X: 2014730                | 3'-Нетранслируемая<br>область                | —//—                       | 5200  | <i>copia</i>                                                       | +  |    |     |
| <i>CG17752</i>                  | 3R: 19622486              | Интрон                                       | —//—                       | 7600  | <i>roo</i>                                                         | +  |    |     |
| <i>CR45822/ pst</i>             | 3L: 7355650–<br>7363640   |                                              | —//—                       | 16000 | Трипликация<br>локуса                                              | +  | +  |     |
| <i>Mur2B</i>                    | X: 1567717–<br>1569443    | Интрон                                       | Делеция                    | 1740  | <i>I</i>                                                           | +  | +  | +   |
|                                 | X: 1628000–<br>1635500    | Интрон                                       | Делеция                    | 7400  | <i>gtwin</i>                                                       | +  | +  | +   |
| <i>su(w[a])</i>                 | X: 1033407–<br>1040982    | 5'-Нетранслируемая<br>область                | Делеция<br>интрона         | 7580  | <i>412</i>                                                         | +  | +  | +   |
| <i>Scgδ</i>                     | X: 1737166–<br>1746272    | 5'-Нетранслируемая<br>область                | Делеция<br>интрона         | 9112  | <i>roo</i>                                                         | +  | +  | +   |
| <i>forked</i>                   | X: 17279030               | Экзон                                        | Инсерция                   | 7400  | <i>gypsy</i>                                                       | +  |    |     |

+ – Инсерции или делеции в анализируемых линиях.

\* Гены системы рiРНК-интерференции.

\*\* Округленное значение, п.н.

нию предшественников транскриптов *flamenco* и уменьшению количества зрелой рiРНК [48]. В линии SS инсерции в этом гене не обнаружено. Следовательно, данные мутации не являются причиной возникновения фенотипа *flamenco*.

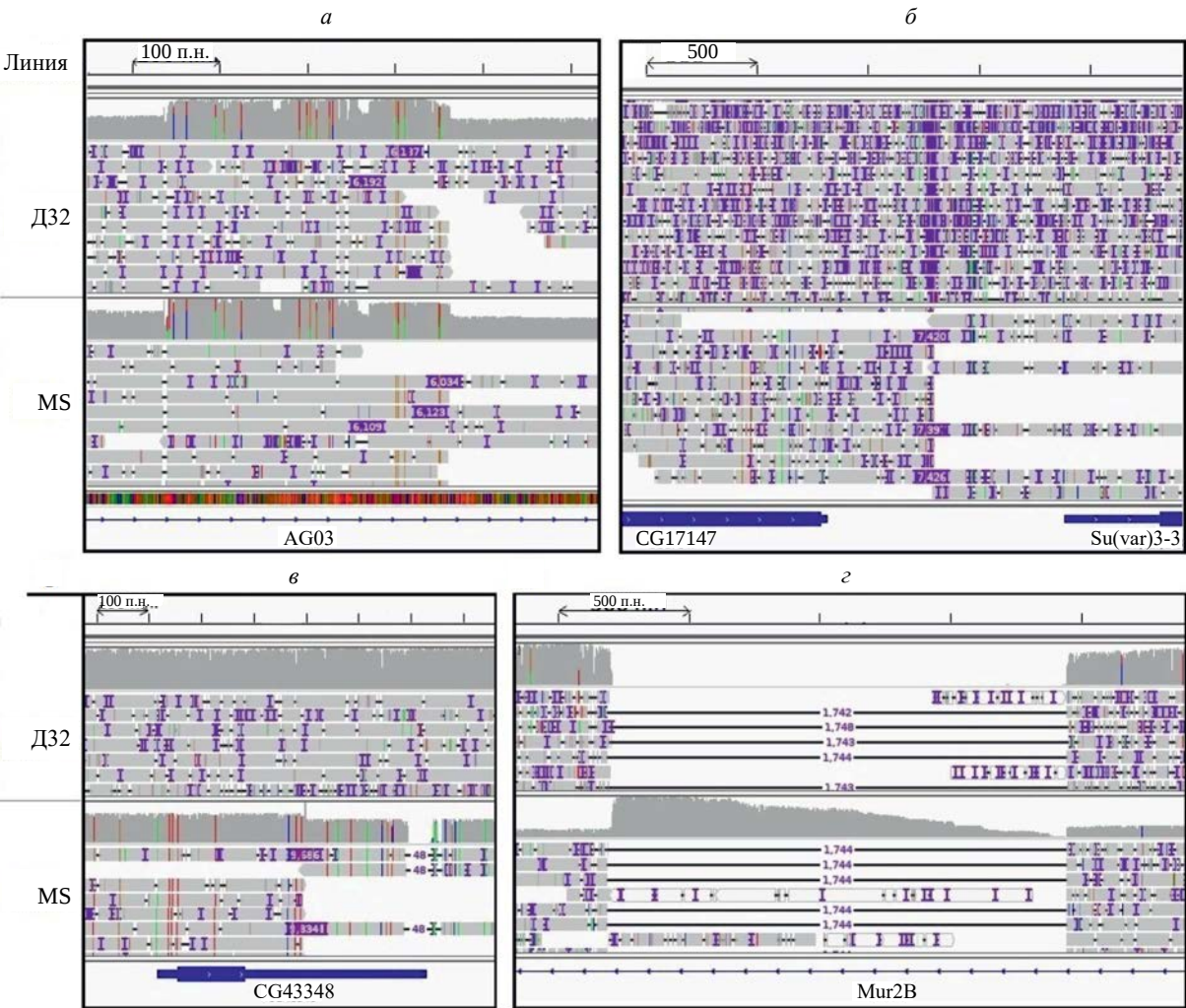
Анализ дифференциально экспрессирующихся генов выявил инсерцию МГЭ *blood* в области

(chr3L:20225801) между генами *CG17147* и *Su(var)3-3* на расстоянии 478 п.н. после гена *CG17147* (рис. 3б, табл. 2). В гене *CG17147* обнаружена инсерция 210 п.н. в интрон, аналогичная инсерция представлена и в линии дикого типа. По данным транскриптомного анализа экспрессия этого гена повышена в 6 раз (табл. 3) [28]. Возможно, эта инсерция могла

**Таблица 3.** Дифференциальная экспрессия генов, содержащих инсерцию/делецию МГЭ или хромосомную перестройку, у линий SS, MS относительно Д32 (метод DESeq)

| Ген            | flybase_id  | SS относительно Д32        |                                | MS относительно Д32        |                                |
|----------------|-------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
|                |             | Log <sub>2</sub> FC SS/Д32 | <i>p</i> <sub>adj</sub> SS/Д32 | Log <sub>2</sub> FC MS/Д32 | <i>p</i> <sub>adj</sub> MS/Д32 |
| <i>CG17147</i> | FBgn0260393 | 4.431                      | 0.050                          | 3.104                      | 0.042                          |
| <i>CG43348</i> | FBgn0263080 | −6.871                     | 0.000                          | −4.463                     | 0.000                          |
| <i>moody</i>   | FBgn0025631 | 1.626                      | 0.043                          | 1.256                      | 0.030                          |
| <i>CG17752</i> | FBgn0038718 | 1.813                      | 0.011                          | 1.061                      | 0.047                          |
| <i>CR45822</i> | FBgn0267472 | 2.286                      | 0.035                          | 1.857                      | 0.046                          |
| <i>pst</i>     | FBgn0035770 | 1.690                      | 0.002                          | 1.169                      | 0.040                          |

Примечание. *p*<sub>adj</sub> – скорректированное значение *p*; Log<sub>2</sub>FC – log<sub>2</sub> отношения уровней экспрессии генов в сравниваемых линиях.



**Рис. 3.** Визуальное отображение результатов анализа нанопорового секвенирования в программе IGV. Серым показаны прочтения, соответствующие референсному геному. Красным, желтым, зеленым отмечены однонуклеотидные полиморфизмы, соответствующие замене определенного нуклеотида. Черные штрихи в прочтении – неопределенные нуклеотиды. Прочтения имеют границы и направление чтения. Фиолетовый прямоугольник с цифрами в прочтениях соответствует инсерциям в генах *AGO3*, *CG43348* и в области между генами *CG17147* и *Su(var)3-3* с указанием длины вставки (а, б, в). Длинные черные линии с цифрами соответствуют делеции в интроне гена *Mur2B* в линиях с указанием длины (г).

повлиять на изменение экспрессии гена, если затронула или принесла энхансерный участок. Интересно, что в 580 п.н. от обнаруженной инсерции расположен ген *Su(var)3-3*. На изменение экспрессии гена *Su(var)3-3* или сплайсинг его мРНК инсерция МГЭ не повлияла. *Su(var)3-3* участвует в образовании гетерохроматина, облегчая метилирование H3K9 [42]. Нокаут гена *Su(var)3-3* приводит к повышению экспрессии определенных групп МГЭ [41]. Не выявлено прямого участия *Su(var)3-3* в процессах сплайсинга транскриптов локусов рiРНК. При этом процесс формирования гетерохроматина с помощью гистон-метилтрансфераз, необходимых для правильной транскрипции локусов, не до конца изучен.

При анализе дифференциально экспрессируемых генов *CG43348*, *moody*, *CG17752* в линии MS обнаружены инсерции МГЭ (рис. 3в, табл. 2). В линии SS не найдено хромосомных перестроек или инсерций МГЭ в этих генах, при этом их экспрессия в линиях MS и SS не отличается. Следовательно, изменения экспрессии генов *CG43348*, *moody*, *CG17752* не связаны с данными мутациями.

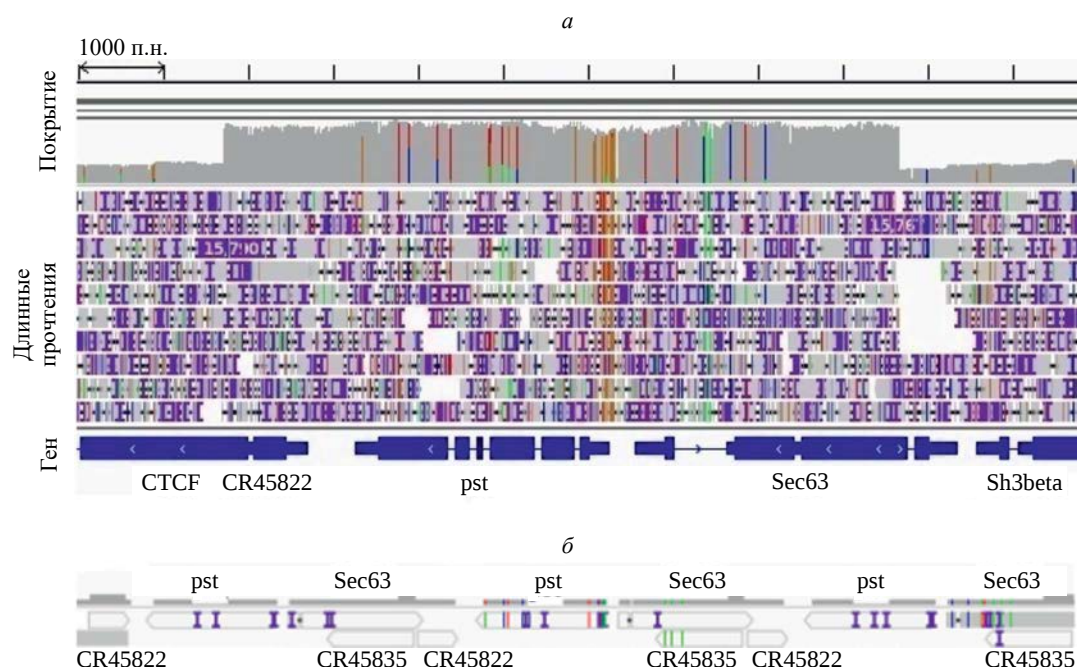
Анализ данных секвенирования транскриптома методом Illumina показал увеличение экспрессии генов *CR45822* и *pst* в несколько раз (табл. 3) в линиях SS и MS относительно линии дикого типа Д32 [30, 31]. Методом ОТ-

ПЦР подтверждено увеличение экспрессии гена *CR45822* на уровне транскрипции в несколько раз в линиях SS и MS относительно линии Д32 (тест Манна–Уитни,  $p < 0.01$ ,  $N = 6$ ).

Важно отметить, что анализ данных секвенирования длинными прочтениями выявил в исследуемом районе крупные инсерции общим размером около 16 т.п.н. Одно прочтение в области, прилегающей к началу гена *CR45822*, другое – на расстоянии около 8 т.п.н. При этом покрытие в данном регионе было заметно выше, чем в остальных областях хромосомы (рис. 4а).

С использованием данных нанопорового секвенирования и программы Canu проведена сборка *de novo* генома мух линии MS. Полученные контиги сопоставлены с последовательностями генов из базы данных FlyBase [12]. В результате найдена трипликация района, охватывающего ген *CR45822* и второй экзон гена *Sec63* размером около 16 т.п.н. (рис. 4б). Этот район не является последовательностью МГЭ и не содержит тандемных повторов.

С целью проверки результатов методом ПЦР в реальном времени определено количество копий гена *CR45822* в геномной ДНК исследуемых линий SS и MS относительно линии дикого типа Д32. В расчетах учитывали эффективность праймеров к исследуемому гену и референсным генам. В результате получено расчетное значение – около трех копий *CR45822*



**Рис. 4.** Трипликация локуса между генами *CR45822* и *CR45835*. Наблюдается увеличение покрытия прочтений между генами *CR45822* и *CR45835* в 2–3 раза (а). На собранном *de novo* участке хромосомы 3L на основе данных нанопорового секвенирования сопоставлены последовательности генов *CR45822*, *CR45835*, *pst*, *Sec63*, *CTCF*. Видна трипликация генов *CR45822*, *CR45835*, *pst*, фрагментов генов *CTCF* и *Sec63*, при этом можно определить собственные полиморфные варианты некоторых генов (б).

в линии MS и родительской линии SS против одной копии в линии дикого типа Д32.

*Инсерции МГЭ в референсном геноме  
относительно исследуемых линий  
и линии дикого типа*

Проведение анализа в определенных положениях референсного генома привело к обнаружению МГЭ, которых не было в этих локусах в линиях SS и MS и линии дикого типа Д32. Мутации этого типа представлены в интроне гена *Mur2B* (рис. 3г, табл. 2) в линиях SS и MS и линии дикого типа Д32. Можно предположить, что произошли эксцизия и транспозиция МГЭ из одного локуса в другой. Однако после эксцизии ретротранспозонов путем гомологичной рекомбинации чаще всего остается одиночный ДКП [49]. При этом в анализируемых линиях эти локусы не содержат фрагментов МГЭ. Соответственно, референсный геном содержит не делецию МГЭ, а инсерцию относительно исследуемой линии, то есть эта инсерция МГЭ в референсном геноме, характерна исключительно для линии дрозофил, использованной при сборке генома.

Существуют и индивидуальные особенности анализируемых линий. Так, лабораторная линия дикого типа содержит делецию МГЭ, не обнаруженную в линиях MS и SS. Подобные геномные перестройки могут использоваться для проведения филогенетического анализа.

Анализ таких кластеров рiРНК, как *flamenco*, *42AB*, *38C*, *80F* [7], выявил значительные различия между референсным геномом и исследуемыми и контрольными лабораторными линиями. Анализ состава МГЭ в кластерах и определение точного количества обнаруженных инсерций и делеций — задача дальнейших исследований.

Можно предположить, что не каждая обнаруженная инсерция МГЭ в ген приводит к нарушению последовательности мРНК. Предполагается, что интроны могут происходить от транспозонов [50–52], возможно также существование механизмов распознавания МГЭ как интрона [51]. Например, в референсном геноме в 5'-нетранслируемой области мРНК генов *su(w[a])* и *Scgd* (табл. 2) присутствуют МГЭ *412* и *roo*, соответственно, представляющие собой интроны. В исследуемых линиях SS и MS и линии дикого типа Д32 в генах *su(w[a])* и *Scgd* этих интронов нет, как нет и последовательности МГЭ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе при помощи секвенирования длинными прочтениями проведен поиск мутаций

в генах системы рiРНК-интерференции и генах, дифференциально экспрессирующихся в геноме линий SS и MS *D. melanogaster*. Обнаружены инсерции МГЭ в генах *AGO3*, *CG17147*, *Su(var)3-3*, *Gasz*, *CG43348*, *moody*, *CG17752*, затрагивающие различные структуры генов. Среди проанализированных генов рiРНК-интерференции линий SS и MS можно отметить перспективный маркер фенотипа *flamenco* — гены *vig* и *Su(var)3-3*. Обнаружены хромосомные перестройки генов *vasa*, *CR45822* и *pst*. Инсерция МГЭ возле гена *CG17147* связана, по-видимому, с увеличением его транскрипции в линиях SS и MS. В связи с тем, что большинство обнаруженных инсерций МГЭ не вызывали изменений экспрессии генов, можно предположить, что эта инсерция повлияла на регуляторную область гена *CG17147*. Не обнаружено также корреляции между изменением положения МГЭ и уменьшением или увеличением экспрессии других дифференциально экспрессируемых генов.

Как правило, при анализе геномных и транскриптомных данных принято опираться на референсный геном. Однако при анализе мобильного компонента генома необходимо учитывать, что референсные геномы сделаны на основании данных генома определенной популяции, обладающей характерными для нее позициями инсерций МГЭ, что может отразиться на интерпретации получаемых результатов. В частности, при использовании программного пакета TLDR [53] для поиска новых вставок МГЭ в геном, можно не учесть популяционные особенности линии и референсного генома, с которым исследуемая линия давно разошлась в ходе эволюции. В результате может быть сделан ошибочный вывод, например, об увеличении количества копий МГЭ в исследуемой линии, а также выполнен неправильный популяционный анализ, учитывающий только увеличение числа копий МГЭ и положение новых копий относительно референсного генома. При исследовании анализируемых геномов обнаружены делеции МГЭ, которые являются инсерциями МГЭ, характерными для референсного генома. Очевидно, что одного референсного генома недостаточно для охвата глобального генетического разнообразия мобильного компонента генома, присутствующего в различных популяциях. В свободном доступе есть данные длинных прочтений основных контрольных линий (Canton-S, OregonR, w<sup>1118</sup> и т.д.) [11]. При этом не обязательно секвенировать все известные линии, достаточно использовать линии, являющиеся отводками или “основой” исследуемой линии. Например, линия w<sup>1118</sup> считается базовой для получения большинства трансгенных линий [54].

Исследование транскриптома методом высокопроизводительного секвенирования, сопоставленного только с одним референсным геном, может не отражать все мутационные события. Например, инсерция МГЭ в 5'-нетранслируемую область может нарушать старт инициации трансляции, тем самым полностью меняя последовательность продукта гена [50–52]. Однако, используя короткие прочтения, можно не только пропустить инсерцию МГЭ, но и не заметить изменений в экспрессии гена. Классические методы определения экспрессии МГЭ методом ПЦР в реальном времени тоже не обеспечивают получение точного результата. Две популяционно различные линии могут содержать разное количество копий МГЭ, но экспрессироваться каждый отдельный элемент будет на одном уровне. Анализ транскриптомных данных будет выявлять повышение экспрессии МГЭ, что можно трактовать как повышение активности этого МГЭ или нарушение работы системы контроля транспозиции.

Возможно, что повышение уровня экспрессии МГЭ *gypsy* в линии MS [27] связано только с увеличением количества копий, а не с нарушением системы piРНК-интерференции. Так как линии SS и MS изогенны, то различия в положении новых инсерций наблюдаются даже при небольшом числе проанализированных генов. Это может быть связано с тем, что линия MS получена из одной особи линии SS, которая имела определенный набор инсерций МГЭ. Возможно, новые инсерции связаны с нарушением работы системы piРНК-интерференции и, таким образом, являются следствием фенотипа *flamenco*. Ранее в работах нашей лаборатории были показаны нарушения процессов сплайсинга транскриптов локуса *flamenco* у линий с фенотипом *flamenco* SS и MS [25]. Этот феномен может быть связан с особенностями структуры и состава кластера МГЭ, что представляет интерес для дальнейших исследований.

Работа получила поддержку программы “Молекулярно-генетические механизмы нестабильности генома и мутагенеза у животных и человека” (грант 13-1-21). Номер ЦИТИС: 121032500085-3.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moschetti R., Dimitri P., Caizzi R., Junakovic N. (2010) Genomic instability of I elements of *Drosophila melanogaster* in absence of dysgenic crosses. *PLoS One*. **5**(10), e13142.
2. Coline G., Theron E., Brasset E., Vaury C. (2014) History of the discovery of a master locus producing piRNAs: the flamenco/COM locus in *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.* **5**, 257.
3. Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W., Kim K., He Z., Sontheimer E.J., Carthew R.W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. **117**(1), 69–81.
4. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. **128**(6), 1089–1103.
5. Aravin A.A., Hannon G.J., Brennecke J. (2007) The piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*. **318**(5851), 761–764.
6. Siomi H., Siomi M.C. (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. **457**(7228), 396–404.
7. Cox D.N., Chao A., Baker J., Chang L., Qiao D., Lin H. (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* **12**(23), 3715–3727.
8. Baumgartner L., Handler D., Platzer S. W., Yu C., Duchek P., Brennecke J. (2022) The *Drosophila* ZAD zinc finger protein Kipferl guides Rhino to piRNA clusters. *Elife*. **11**, e80067.
9. Czech B., Malone C.D., Zhou R., Stark A., Schlingehayde C., Dus M., Perrimon N., Kellis M., Wohlschlegel J.A., Sachidanandam R., Hannon G.J., Brennecke J. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*. **453**(7196), 798–802.
10. Flutre T., Duprat E., Feuillet C., Quesneville H. (2011) Considering transposable element diversification in *de novo* annotation approaches. *PLoS One*. **6**(1), e16526.
11. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2012) GenBank. *Nucl. Acids Res.* **41**, D36–D42.
12. Larkin A., Marygold S.J., Antonazzo G., Attrill H., dos Santos G., Garapati P.V., Goodman J.L., Gramates L.S., Millburn G., Strelets V.B., Tabone C.J., Thurmond J., FlyBase Consortium (2021) FlyBase: updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. *Nucl. Acids Res.* **49**, D899–D907.
13. Rech G.E. (2021) Fasta sequences for the *Drosophila melanogaster* manually curated transposable elements (MCTE) library. [https://www.lareferencia.info/vufind/Record/ES\\_a77af0688d4516b156d77549ef-83f0e4#core](https://www.lareferencia.info/vufind/Record/ES_a77af0688d4516b156d77549ef-83f0e4#core)
14. Simmons M.J., Thorp M.W., Buschette J.T., Peterson K., Cross E.W., Bjorklund E.L. (2010) Maternal impairment of transposon regulation in *Drosophila melanogaster* by mutations in the genes *aubergine*, *piwi*

- and *Suppressor of variegation* 205. *Genet. Res.* **92**(4), 261–272.
15. Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. (2011) Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster*. *Вавиловский журн. генетики и селекции.* **15**(2), 225–260.
  16. Rech G.E., Radío S., Guirao-Rico S., Aguilera L., Horvath V., Green L., Lindstadt H., Jamilloux V., Quesneville H., González J. (2022) Population-scale long-read sequencing uncovers transposable elements associated with gene expression variation and adaptive signatures in *Drosophila*. *Nat. Commun.* **13**(1), 1948.
  17. Mohamed M., Dang N.T., Ogyama Y., Burlet N., Mugat B., Boulesteix M., Mérel V., Veber P., Salces-Ortiz J., Severac D., Péllisson A., Vieira C., Sabot F., Fablet M., Chambeyron S. (2020) A transposon story: from TE content to TE dynamic invasion of *Drosophila* genomes using the single-molecule sequencing technology from Oxford nanopore. *Cells.* **9**(8), 1776.
  18. Rang F.J., Kloosterman W.P., de Ridder J. (2018) From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol.* **19**(1), 90.
  19. Li H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv preprint arXiv:1303.3997*.
  20. Li H. (2018) Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* **34**(18), 3094–3100.
  21. Sedlazeck F.J., Rescheneder P., Smolka M., Fang H., Nattestad M., von Haeseler A., Schatz M.C. (2018) Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat. Methods.* **15**(6), 461–468.
  22. Kiełbasa S.M., Wan R., Sato K., Horton P., Frith M.C. (2011) Adaptive seeds tame genomic sequence comparison. *Genome Res.* **21**(3), 487–493.
  23. Chaisson M.J., Tesler G. (2012) Mapping single molecule sequencing reads using basic local alignment with successive refinement (BLASR): application and theory. *BMC Bioinformatics.* **13**(1), 238.
  24. Xiao C.L., Chen Y., Xie S.Q., Chen K.N., Wang Y., Han Y., Luo F., Xie Z. (2017) MECAT: fast mapping, error correction, and *de novo* assembly for single-molecule sequencing reads. *Nat. Methods.* **14**(11), 1072–1074.
  25. Лавренов А.Р., Нефедова Л.Н., Романова Н.И., Ким А.И. (2014) Экспрессия генов семейства *hp1* и их возможная роль в формировании фенотипа flamenco у *D. melanogaster*. *Биохимия.* **79**(11), 1554–1560.
  26. Кукушкина И.В., Махновский П.А., Нефедова Л.Н., Балакирева Е.А., Романова Н.И., Кузьмин И.В., Лавренов А.Р., Ким А.И. (2020) Исследование фертильности линии *Drosophila melanogaster* MS с нарушением контроля транспозиции мобильного элемента *gypsy*. *Молекуляр. биология.* **54**(3), 412–425.
  27. Kim A.I., Lyubomirskaya N.V., Belyaeva E.S., Shostack N.G., Ilyin Y.V. (1994) The introduction of a transpositionally active copy of retrotransposon GYPSY into the stable strain of *Drosophila melanogaster* causes genetic instability. *Mol. Gen. Genet. MGG.* **242**(4), 472–477.
  28. Кукушкина И.В., Махновский П.А., Нефедова Л.Н., Миляева П.А., Кузьмин И.В., Лавренов А.Р., Ким А.И. (2020) Анализ транскриптома линий *Drosophila melanogaster* с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*. *Генетика.* **56**(5), 550–560.
  29. Andrews S., Krueger F., Segonds-Pichon A., Biggins L., Krueger C., Wingett S. (2010) FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. **370**.
  30. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* **30**(15), 2114–2120.
  31. Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**(4), 1–13.
  32. Anders S., Pyl P.T., Huber W. (2015) HTSeq – a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* **31**(2), 166–169.
  33. Anders S., Huber W. (2012) Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. *Eur. Mol. Biol. Lab. (EMBL), Heidelberg.* **10**, f1000research.
  34. Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* **27**(5), 722–736.
  35. Thorvaldsdottir H., Robinson J.T., Mesirov J.P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**(2), 178–192.
  36. Cooley M.B., Yoder J.I., Goldsborough A.P., Still D.W. (1996) Site-selected insertional mutagenesis of tomato with maize *Ac* and *Ds* elements. *Mol. Gen. Genet. MGG.* **252**(1–2), 184–194.
  37. Kay M., Hojati Z., Heidari M., Bazi Z., Korbekandi H. (2015) Effects of disruption of the nucleotide pattern in CRID element and Kozak sequence of interferon  $\beta$  on mRNA stability and protein production. *Autoimmunity.* **48**(5), 336–343.
  38. Ким А.И., Беляева Е.С., Ларкина З.Г., Асланян М.М. (1989) Генетическая нестабильность и транспозиции мобильного элемента МДГ4 в мутаторной линии *Drosophila melanogaster*. *Генетика.* **25**(10), 1747–1756.
  39. Prud'homme N., Gans M., Masson M., Terzian C., Bucheton A. (1995) *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **139**(2), 697–711.
  40. Leblanc P. (1997) Invertebrate retroviruses: ZAM a new candidate in *D. melanogaster*. *EMBO J.* **16**(24), 7521–7531.
  41. Czech B., Preall J.B., McGinn J., Hannon G.J. (2013) A transcriptome-wide RNAi screen in the *Drosophila* ovary reveals factors of the germline piRNA pathway. *Mol. Cell.* **50**(5), 749–761.

42. Gracheva E., Dus M., Elgin S.C. (2009) *Drosophila* RISC component VIG and its homolog Vig2 impact heterochromatin formation. *PLoS One*. **4**(7), e6182.
43. Carrera P., Johnstone O., Nakamura A., Casanova J., Jackle H., Lasko P. (2000) Vasa mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol. Cell*. **5**, 181–187.
44. Jankowsky E. (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem. Sci.* **36**(1), 19–29.
45. Styhler S., Nakamura A., Swan A., Suter B., Lasko P. (1998) *vasa* is required for Gurken accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*. **125**, 1569–1578.
46. Tomancak P., Guichet A., Zavorszky P., Ephrussi A. (1998) Oocyte polarity depends on regulation of *gurken* by Vasa. *Development*. **125**, 1723–1732.
47. Pek J.W., Kai T. (2011) A role for Vasa in regulating mitotic chromosome condensation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **21**, 39–44.
48. Munafò M., Manelli V., Falconio F.A., Sawle A., Kneuss E., Eastwood E.L., Seah J.E., Czech B., Hannon G.J. (2019) Daedalus and Gasz recruit Armitage to mitochondria, bringing piRNA precursors to the biogenesis machinery. *Genes Dev.* **33**(13–14), 844–856.
49. Stoye J.P. (2001) Endogenous retroviruses: still active after all these years? *Curr. Biol.* **11**(22), R914–R916.
50. Kaer K., Speck M. (2012) Intronic retroelements: Not just “speed bumps” for RNA polymerase II. *Mobile Genetic Elements*. **2**(3), 154–157.
51. Saze H. (2018) Epigenetic regulation of intragenic transposable elements: a two-edged sword. *J. Biochem.* **164**(5), 323–328.
52. Rogers S.O., Bendich A.J. (2023) Introns are derived from transposons. *bioRxiv*, 2023-02.
53. 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**(5), 915–928.e5.
54. Dietzl G., Chen D., Schnorrrer F., Su K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oppel S., Scheiblauer S., Couto A., Marra V., Keleman K., Dickson B.J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. **448**(7150), 151–156.

## Search for the Insertions and Chromosomal Rearrangements Affecting Changes in Gene Expression in *D. melanogaster* Strains with Impaired Transposition Control of the gypsy Retrotransposon

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

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

<sup>2</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>3</sup>Faculty of Biology, Longgang District, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, 518172 China

\*e-mail: vladimirova-bph@yandex.ru

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

Transposable elements (TE) increase the frequency of spontaneous mutations in the genome and are also capable of altering function and affecting gene expression, so it is important to have an idea of their activity and position in the genome. The paper demonstrates the advantage of combining the analysis of two sequencing methods of searching TE insertions and chromosomal rearrangements: full-genome nanopore sequencing allows the detection of TE insertions, and the use of transcriptome sequencing evaluates the effect of insertions on gene expression. The results are presented using SS (*w*<sup>1</sup>, *flamenco* mutant) and MS (*w*<sup>1</sup>, *flamenco* mutant, active copy of *gypsy*) strains with the flamenco phenotype as an example to investigate the causes of impaired control of TE activity. The laboratory wild type strain D32 was used as a control. Insertions and deletions of TE into the euchromatin regions of the genome and into the introns of genes relative to the reference genome were found in the studied strains and wild-type strains. In the analyzed genomes, a search for insertions and deletions in RNA interference system genes and in differentially expressed genes in SS and MS strains with flamenco phenotype was performed. We have detected TE insertions in various structures of *AGO3*, *CG17147*, *Su(var)3-3*, *Gasz*, *CG43348*, *moody*, *CG17752* genes. For most of the analyzed genes, no correlation between a change in the TE position and a decrease or increase in gene transcription was found. A chromosomal rearrangement affecting the 3'-untranslated region has been detected for the *vig* gene. Based on the results of long-read sequencing, a *de novo* genome assembly for the MS strain was obtained. The increased expression in SS and MS strains for *CR45822* and *pst* genes was found to be associated with triplication, but not with changes in gene regulatory sequences or TE insertion.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, mobile genetic elements, evolution, Oxford Nanopore, Illumina, genome assembly

# ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *KLF5* В КЛЕТКАХ ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. М. В. Зиновьева<sup>а</sup>, Л. Г. Николаев<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*e-mails: lev@ibch.ru, kinvel@gmail.com

Поступила в редакцию 22.01.2024 г.

После доработки 05.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma, PDAC) характеризуется неблагоприятным прогнозом и плохо поддается современным методам лечения. Моделью развития PDAC может служить ряд клеточных культур, отражающих различные степени дифференцировки и злокачественности опухоли. Высокодифференцированные низкоклеточные клетки отличаются повышенной экспрессией гена *KLF5*. Белок *KLF5* — яркий представитель многофункциональных факторов транскрипции, участвует во множестве клеточных процессов, в частности, связанных с различными видами рака. Методом циркулярной идентификации конформации хромосомы (4C-seq) нами изучена пространственная организация хроматина, включающего регуляторные области гена *KLF5*, в высокодифференцированных клетках PDAC Сарап2 с высоким уровнем экспрессии *KLF5* и в низкодифференцированных клетках PDAC MIA PaCa2 с низким уровнем экспрессии этого гена. Выявлены существенные различия в числе и распределении контактов регуляторной области *KLF5* с другими областями хроматина в этих типах клеток: в клетках Сарап2 число контактов значительно выше. Существует корреляция между уровнем экспрессии соседствующих с *KLF5* генов и интенсивностью их контактов с регуляторной областью *KLF5*, что указывает на согласованность их экспрессии, возможно, в рамках транскрипционной фабрики. Для Сарап2 характерен высокий уровень контактов регуляторной области *KLF5* со свободным от генов участком генома, содержащим кластер ассоциированных с PDAC полиморфных сайтов (SNP/InDel). Таким образом, при повышении степени злокачественности клеток наблюдается снижение общего числа контактов промоторной области гена *KLF5* и уровня экспрессии большинства окружающих *KLF5* генов.

**Ключевые слова:** протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, *KLF5*, хроматин, пространственная структура, регуляция транскрипции

DOI: 10.31857/S0026898424050069, EDN: HUOYYD

## ВВЕДЕНИЕ

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma, PDAC) занимает четвертое место среди причин смертности от рака [1], характеризуется неблагоприятным прогнозом (5-летняя выживаемость менее 10%) и плохо поддается существующим методам лечения [2, 3].

Для понимания механизмов развития онкопатологий важно изучать взаимодействие различных генов и регуляцию их активности. Современные методы молекулярного картирования позволяют выявить в геноме регуляторные области целевых генов и оценить влияние их окружения. Эпигенетические механизмы, регулирующие такие сети, например, ремоделирование хроматина путем модификации гистонов [4] и изменения пространственной организации хроматина [5], также привлекают

Сокращения: PDAC — протоковая аденокарцинома поджелудочной железы; 4C-seq — циркулярная идентификация конформации хромосомы; SNP — однонуклеотидный полиморфизм; FDR — доля ложных заключений (false discovery rate); TAD — топологически ассоциированный домен; FPKM — число фрагментов, картирующихся в 1000 п.н., на миллион прочтений (Fragments Per Kilobase Million).

значительное внимание. В данной работе нами изучено влияние геномного окружения гена транскрипционного фактора *KLF5* на прогрессию PDAC человека.

Развитие PDAC сопровождается дерегулированием согласованной активности транскрипционных факторов, в частности, нарушением регуляторных взаимодействий в транскрипционных сетях, необходимых для правильной дифференцировки и развития клеток поджелудочной железы, что направляет их развитие к агрессивному злокачественному фенотипу [6].

Моделью развития PDAC может служить ряд клеточных культур, отражающих различные степени дифференцировки и злокачественности (grade) опухоли. Показано, что в ряду линий клеток CFPAC1, Capan2, HPAF2, Capan1, Bx-PC3, AsPC1, PANC1, MIA PaCa2 повышается степень злокачественности и понижается степень дифференцировки опухолевых клеток, при этом происходит согласованное повышение или понижение уровней транскрипции ряда генов транскрипционных факторов [7]. В частности, высокодифференцированные низкоккачественные клетки характеризуются повышенной транскрипцией генов *ELF3*, *FOXA1*, *KLF5*, *HNF1B* и др., тогда как в низкодифференцированных и высокозлокачественных клетках на высоком уровне транскрибируются, в том числе, гены *ZEB1*, *GATA2*, *ETV5* и *TCF12*. Эти данные подтверждены нами ранее для этих и некоторых других факторов транскрипции как на уровне транскрипции, так и на уровне синтеза соответствующих белков [8]. Мы предположили, что клетки линий MIA PaCa2 и Capan2 могут наилучшим образом моделировать соответственно мезенхимальный (низкодифференцированный, высокозлокачественный) и эпителиальный (выкодифференцированный, низкоккачественный) этапы развития PDAC.

Один из ключевых факторов транскрипции, определяющих прогрессию PDAC [9], – Kruppel-подобный фактор 5 (Kruppel-Like Factor 5, *KLF5*), принадлежит к семейству транскрипционных факторов KLF, состоящему более чем из 20 членов [10]. Ген *KLF5* располагается вблизи одного из локусов предрасположенности к PDAC, содержащих несколько SNP, ассоциированных с PDAC [11–13]. Фактор транскрипции *KLF5* является ярким представителем многофункциональных белков, он вовлечен во множество клеточных процессов, определяющих, в частности, патологические изменения при различных видах рака [9, 14], сердечно-сосудистых заболеваниях [15], болезнях почек [16] и др. Ген *KLF5* принимает

непосредственное участие и в прогрессии PDAC у мышей [17], он экспрессируется на высоком уровне в низкоккачественных клетках PDAC в культуре [7, 8].

В настоящей работе методом циркулярной идентификации конформации хромосомы (Circular Chromosome Conformation Capture, 4C-seq) нами изучена пространственная организация хроматина, включающего регуляторные области гена *KLF5*, в культурах высокодифференцированных клеток PDAC (клетки Capan2) с высоким уровнем экспрессии *KLF5* и низкодифференцированных клеток PDAC MIA PaCa2 с низким уровнем экспрессии этого гена. Такой подход позволил нам выявить изменения в пространственной организации хроматина вблизи промоторной области гена *KLF5* при переходе клеток от низкоккачественного к высококкачественному состоянию и, соответственно, при переходе экспрессии гена *KLF5* от высокого уровня к низкому.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеток.** Клеточную линию рака поджелудочной железы человека MIA PaCa2 (ATCC CRL-1420) культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мг/мл амфотерицина (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”, США). Клеточную линию PDAC человека Capan2 (ATCC HTB-80) культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 12.5% FBS и тех же антибиотиков. Клетки выращивали при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C и влажности 90%.

**Получение 4C библиотек.** Для получения 4C библиотек использовали в основном протокол van de Werken H.J. и соавт. [18] с модификациями. Клетки (~10<sup>7</sup>) обрабатывали 2.25%-ным формальдегидом в течение 10 мин, собирали центрифугированием и ресуспендировали в 5 мл 50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 0.5% NP-40, 1% Тритона X-100 с добавлением 25 мкл коктейля ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich” P8340, США). Далее клетки обрабатывали эндонуклеазой Hind III (FastDigest, “Thermo Scientific”, США) в соответствии с протоколом [18] полноту расщепления контролировали электрофорезом в агарозном геле. Фермент инактивировали (20 мин, 80°C), ДНК лигировали при высоком разведении с использованием лигазы (5 ед./мкл) и буфера для лигирования (“Thermo Scientific”). Далее ДНК очищали согласно протоколу, расщепляли Dpn II (“New England Biolabs” R0543T, США) и повторно лигировали. Для каждого типа клеток получено

по два независимых образца сшитой библиотеки, а также дополнительно по контрольной библиотеке, полученной по той же схеме, но без добавления формальдегида (несшитый контроль).

В качестве якорных точек (viewpoints, baits) были выбраны два фрагмента Hind III–Dpn II генома человека (K1 и K3), максимально сближенных с точкой начала транскрипции гена *KLF5* и с последовательностью [19], необходимой для активности гена (см. дополнительный рис. S1 см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Zinovyeva\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Zinovyeva_rus.zip)).

Библиотеки последовательностей, лигирующихся с этими якорями, далее получали при помощи двустадийной обращенной ПЦР. Структуры праймеров для амплификации методом обращенной ПЦР приведены в табл. 1. Там же приведены структуры вспомогательных последовательностей, необходимых для масштабного секвенирования на секвенаторах Illumina. Окончательная структура библиотек после двух стадий ПЦР приведена на рис. 1а.

ПЦР библиотек проводили в два этапа — на первом этапе к последовательностям библиотеки добавляли индекс и праймеры P7 и read-

ing primer (Illumina, США), на втором этапе (step-out) к 5'-концу добавляли последовательность, содержащую праймер P5 (Illumina, США). Оба этапа ПЦР проводили при двух температурах отжига — два первых цикла при температуре отжига геномной части праймера (52–55°C), а затем 30–32 цикла при более высокой температуре отжига полного праймера (60–65°C). Реакцию первого этапа проводили в объеме 800 мкл (16 × 50 мкл), второго этапа — в объеме 100 мкл (4 × 25 мкл) с использованием полимеразы Encyclo (“Евроген”, Россия) и амплификатора PTC-100 (“MJ Research”, США). Продукт очищали согласно [18]. Условия амплификации каждой из библиотек приведены в табл. S1 (см. Дополнительные материалы на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Zinovyeva\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Zinovyeva_rus.zip)), а картина электрофореза амплифицированных библиотек в агарозном геле — на рис. 1б.

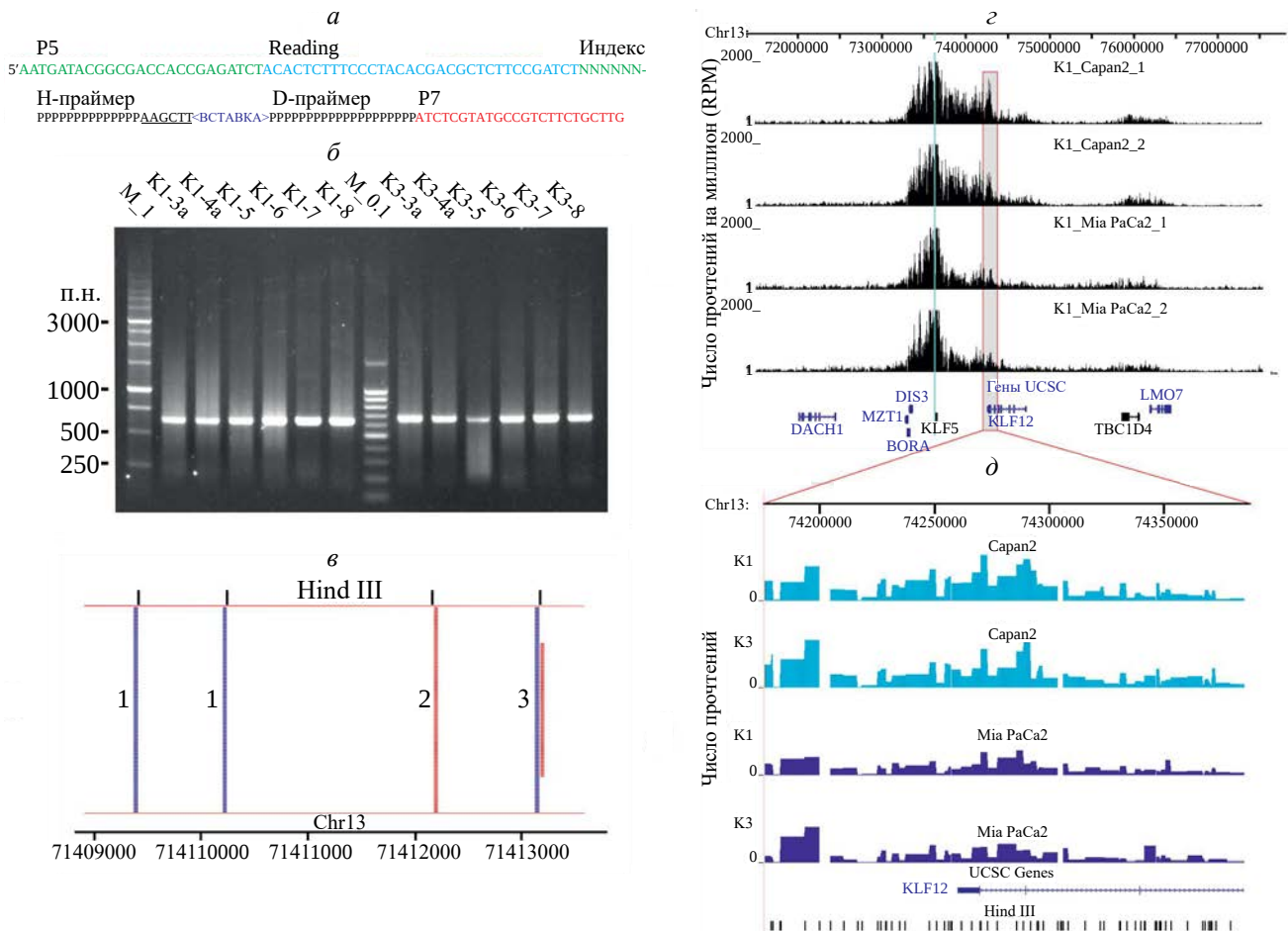
Смесь равных количеств библиотек (суммарно ~400 нг) передана в компанию “Евроген” для секвенирования.

**Секвенирование и картирование.** Смесь библиотек секвенировали при помощи системы Illumina NovaSeq 6000 в формате односторонних прочтений 1 × 100 п.н. В результате полу-

Таблица 1. Структура праймеров для ПЦР

| Библиотека                                                  | Праймер                                                       |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>Праймеры Hind III (H-primers) для первого этапа ПЦР*</i> |                                                               |
| Библиотека K1H-3а                                           | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/ATCACG/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K1H-4а                                                      | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/CGATGT/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K1H-5                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/TTAGGC/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K1H-6                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/CAGATC/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K1H-7                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/ACTTGA/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K1H-8                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/GATCAG/CATGCTTTCATTTACAAAAGCTT         |
| K3H-3а                                                      | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/ATCACG/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| K3H-4а                                                      | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/CGATGT/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| K3H-5                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/TTAGGC/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| K3H-6                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/CAGATC/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| K3H-7                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/ACTTGA/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| K3H-8                                                       | 5'ACACGACGCTCTTCCGATCT/GATCAG/TTTTGTGCAATGAAAAAGCTT           |
| <i>Праймеры Dpn II (D-primers) для первого этапа ПЦР**</i>  |                                                               |
| Праймер K1D2N                                               | 5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT/TCATCAGCCATTCTCTGAAGG              |
| Праймер K3D3N                                               | 5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT/TCCAGGTTCTACATTGGCTTG              |
| <i>Праймеры для второго (step-out) этапа ПЦР***</i>         |                                                               |
| Праймер SO2                                                 | 5'AATGATACGGCGACCAACCGAGATCT/ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT |

\* Слева направо (части праймера разделены косой чертой): Reading primer (Illumina, частично), индекс, уникальная часть со стороны Hind III.  
\*\* Слева направо: праймер P7 (Illumina), уникальная часть со стороны Dpn II.  
\*\*\* Слева направо: праймер P5 (Illumina), Reading primer (Illumina). Со стороны Dpn II использовали праймеры K1D2N и K3D3N.



**Рис. 1.** Структура и секвенирование библиотек. *a* – Структура библиотек. P5, P7, Reading – последовательности для секвенирования Illumina; H- и D-праймеры – уникальные праймеры для обратной ПЦР со стороны сайтов Hind III и Dpn II соответственно; индекс – индексные последовательности; вставка – амплифицированная геномная последовательность, контактирующая с якорем. *б* – Электрофорез в агарозном геле 4С библиотек после второго этапа ПЦР-амплификации. Номер библиотеки соответствует номеру праймера Hind III (см. табл. 1). M\_1 и M\_0.1 – ДНК-маркеры 1 и 0.1 т.п.н. соответственно. *в* – Типичное расположение прочтений относительно сайтов расщепления Hind III в участке хромосомы 13. Представлены три варианта лигирования: (1) по одной из цепей; (2) по противоположной цепи; (3) по обеим цепям с разной эффективностью. Рисунок подготовлен при помощи пакета SeqMonk (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk>). *г* – Расположение контактных участков в области хромосомы 13 длиной 6 млн.п.н. вокруг гена *KLF5*. По оси ординат отложено число прочтений на миллион (RPM) в соответствующей библиотеке, синяя вертикальная линия показывает положение якорных последовательностей. В двух верхних дорожках показано распределение контактов якорной последовательности K1 и клеток Capan2 в двух независимых экспериментах; в следующих двух дорожках – те же данные для клеток MIA PaCa2. *д* – Расположение контактных участков в небольшой (200 т.п.н.) области хромосомы 13 вблизи гена *KLF12*. По оси ординат отложено число прочтений в соответствующей библиотеке. Две верхние дорожки позволяют сравнить распределение контактов якорных последовательностей K1 и K3 в клетках Capan2, следующие две дорожки – те же для клеток MIA PaCa2. Внизу показано расположение сайтов расщепления Hind III.

чено более 150 млн прочтений. Прочтения были демультиплицированы при помощи программы grep пакета SeqKit [20] и картированы на геном человека (сборка GRCh37/hg19) при помощи программы bowtie ver. 1 [21] (опции – best, -n 2). Данные по эффективности картирования приведены в дополнительной табл. S2.

В результате получены и секвенированы 12 библиотек. По четыре библиотеки содержали (в двух повторностях) потенциальные контакты регуляторной области гена *KLF5* с отдаленными областями генома в двух линиях клеток

(MIA PaCa2 и Capan2) и двух соседних якорных точках (viewpoints). Четыре контрольные библиотеки (те же клетки и якорные точки без повторностей) получены без фиксации клеток формальдегидом. Результаты секвенирования занесены в базу данных NCBI SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) и доступны под номером PRJNA1016108.

**Анализ контактов и обработка результатов.** Файлы картированных библиотек преобразовывали в формат bam при помощи пакета Samtools [22] и наиболее вероятные

места контактов выявляли с использованием специализированных программных пакетов R3Cseq [23] FourCSeq [24] и peakC [25] в программной среде R (<https://www.r-project.org/about.html>). Дифференциальные контакты выявляли с использованием R-пакета 4C-ker [26].

**Дополнительные ресурсы.** Использовали также R-пакеты xlsx (<https://cran.r-project.org/web/packages/xlsx/>), openxlsx (<https://cran.r-project.org/web/packages/openxlsx/index.html>), broman (<https://cran.r-project.org/web/packages/broman/index.html>), REDseq (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/REDseq.html>).

В геномном анализе использовали UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>, [27, 28]), 3D Genome Browser (<http://3dgenome.fsm.northwestern.edu/index.html>), а также базы данных проекта ENCODE (<https://www.encodeproject.org>, [29]), NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, [30]) и GeneCards (<https://www.genecards.org>, [31]).

Для первичной визуализации и контроля результатов секвенирования и картирования применяли программу анализа данных секвенирования SeqMonk (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор клеток, конструирование и картирование библиотек.** Для исследования пространственной структуры хроматина в области промотора гена *KLF5* из имеющегося спектра клеток, происходящих из тканей на разных стадиях PDAC, мы выбрали две линии, соответствующие крайним стадиям развития опухоли. Клетки линии MIA PaCa2 конститутивно экспрессируют мезенхимальные гены и моделируют высокозлокачественную PDAC, тогда как линия Saran2 относится к эпителиальному типу и по спектру экспрессируемых белков может служить моделью низкоккачественной опухоли [7, 32]. Ранее показали, что ген *KLF5* и соответствующий белок экспрессируются на высоком уровне в низкоккачественных клетках PDAC, включая Saran2, и на два порядка слабее в высокозлокачественных MIA PaCa2 [7, 8].

О регуляции экспрессии самого гена *KLF5* известно довольно мало. Промотор этого гена в геноме человека находится внутри области  $-751...+232$  и содержит последовательность CGCCCGCGC, связывающую фактор транскрипции EGR1 в гладкомышечных клетках сосудов [33]. Промотор *KLF5* не имеет ТАТА-последовательности и содержит сайт связывания фактора SP1 с координатами  $-239...-219$  [34].

С использованием репортерного гена выявлена минимально необходимая для активности промотора область длиной 186 п.н. ( $-68...+118$ ), содержащая несколько GC-богатых сайтов. Связывание с одним из них фактора SP3 также необходимо для базальной транскрипции *KLF5* [19]. Один из предполагаемых энхансеров гена *KLF5*, активный в клетках HT29 колоректальной аденокарциномы человека, располагается в области примерно  $+371000$  п.н. и имеет длину 277 п.н. [35] (рис. S1, см. электронное приложение).

Белок *KLF5* взаимодействует с суперэнхансерами [36] и вместе с рядом других факторов транскрипции выполняет роль мастер-регулятора при раке пищевода [37, 38]. В свою очередь, сам ген *KLF5* может находиться под контролем суперэнхансера [39].

Мы исследовали пространственную организацию хроматина вблизи промоторной области гена *KLF5* в высокодифференцированной низкоккачественной линии клеток PDAC (клетки Saran2) с высоким уровнем экспрессии *KLF5* и в низкодифференцированной высокозлокачественной линии MIA PaCa2 с пониженным уровнем экспрессии этого гена. Использовали метод 4C-seq и расщепление ферментами Hind III и Dpn II. Для повышения надежности результатов выбраны две якорные последовательности, прилегающие к ближайшему к точке начала транскрипции *KLF5* сайту расщепления Hind III (см. рис. S1). Получены, секвенированы и картированы на геном человека (сборка GRCh37/hg19) 12 библиотек (по две биологических повторности для каждого из якорей и двух типов клеток, плюс по одной повторности для контрольных библиотек без обработки формальдегидом, см. электронное приложение, табл. S2), в среднем около  $10^7$  прочтений на библиотеку. Типы расположения прочтений относительно сайтов расщепления Hind III приведены на рис. 1в.

**Воспроизводимость результатов.** Прочтения полученных библиотек в формате bedGraph визуализовали в геномном браузере UCSC, после чего сравнивали биологические повторы для якоря K1 и клеток MIA PaCa2 и Saran2 (рис. 1з), а также результаты для якорных последовательностей K1 и K3 (рис. 1д). Видно, что общая картина распределения числа прочтений хорошо воспроизводится в независимых повторах, а также сходна при использовании близких по расположению якорных последовательностей. Коэффициент корреляции Пирсона в случае биологических повторов составил 0.98–0.99. Для дальнейшего анализа объединили результаты, полученные для якорей K1 и K3.

**Идентификация контактов.** В данной работе мы ограничили анализ контактов относительно небольшой областью хромосомы 13 человека, включающей примерно по 3 млн п.н. с 5'- и 3'-стороны от якорной точки (точнее, с 70671801 по 76628882 п.н.). По нашим данным, эта область содержит основную часть обнаруженных контактов. Более удаленные от *KLF5* контактирующие области будут предметом отдельного анализа.

Для анализа данных 4C-seq и выявления наиболее достоверных участков контакта мы применили три наиболее активно используемых с этой целью программных пакета: R3Cseq [23] FourCSeq [24] и peakC [25]. Так как в этих программах используются разные алгоритмы определения базовой линии, а также разные форматы представления и визуализации результатов, прямое сравнение данных, полученных с их помощью, затруднительно. Поэтому для сравнения результатов мы использовали общий для этих программ параметр — *P*-значение, с поправкой на долю ложных заключений (FDR, False Discovery Rate), определяющее в данном случае значимость отличия величины наблюдаемого сигнала от расчетной базовой линии. Для удобства этот параметр представлен в виде отрицательного логарифма  $-\lg(P\text{-value})$ , а его распределение в обеих линиях клеток и трех использованных программах можно видеть на рис. 2. Область длиной 15 т.п.н. по обе стороны от якоря не рассматривали в связи с высокой вероятностью неспецифического лигирования [23].

Контакты считали значимыми в тех случаях, когда наблюдаемое *P*-значение было ниже порогового (0.01 для R3Cseq и FourCSeq, 0.05 для peakC, рис. 2) одновременно во всех трех пакетах программ. Чтобы получить представление о степени достоверности контакта каждой точки с учетом результатов всех трех программ, мы рассчитали объединенное *P*-значение. Так как *P*-значения, генерируемые тремя программами с разными алгоритмами и методами определения базовой линии в одной и той же точке контакта, могут отличаться на порядок и более (см. рис. 2), мы нормировали эти значения для каждой отобранной точки контакта (представлены в виде  $-\lg(P\text{-value})$ ) на сумму значений всех отобранных контактов в исследованной области генома. Коэффициент нормирования был принят равным единице для FourCseq. После этого суммировали нормированные значения  $-\lg(P\text{-value})$  в каждой точке контакта. Такая операция позволяет уравнивать вклад каждой из программ в суммарное значение объединенного параметра  $-\lg(P\text{-value})$ , а величина параметра будет указывать на степень значимости данного контакта. Результаты приведены в дополнительной табл. S3.

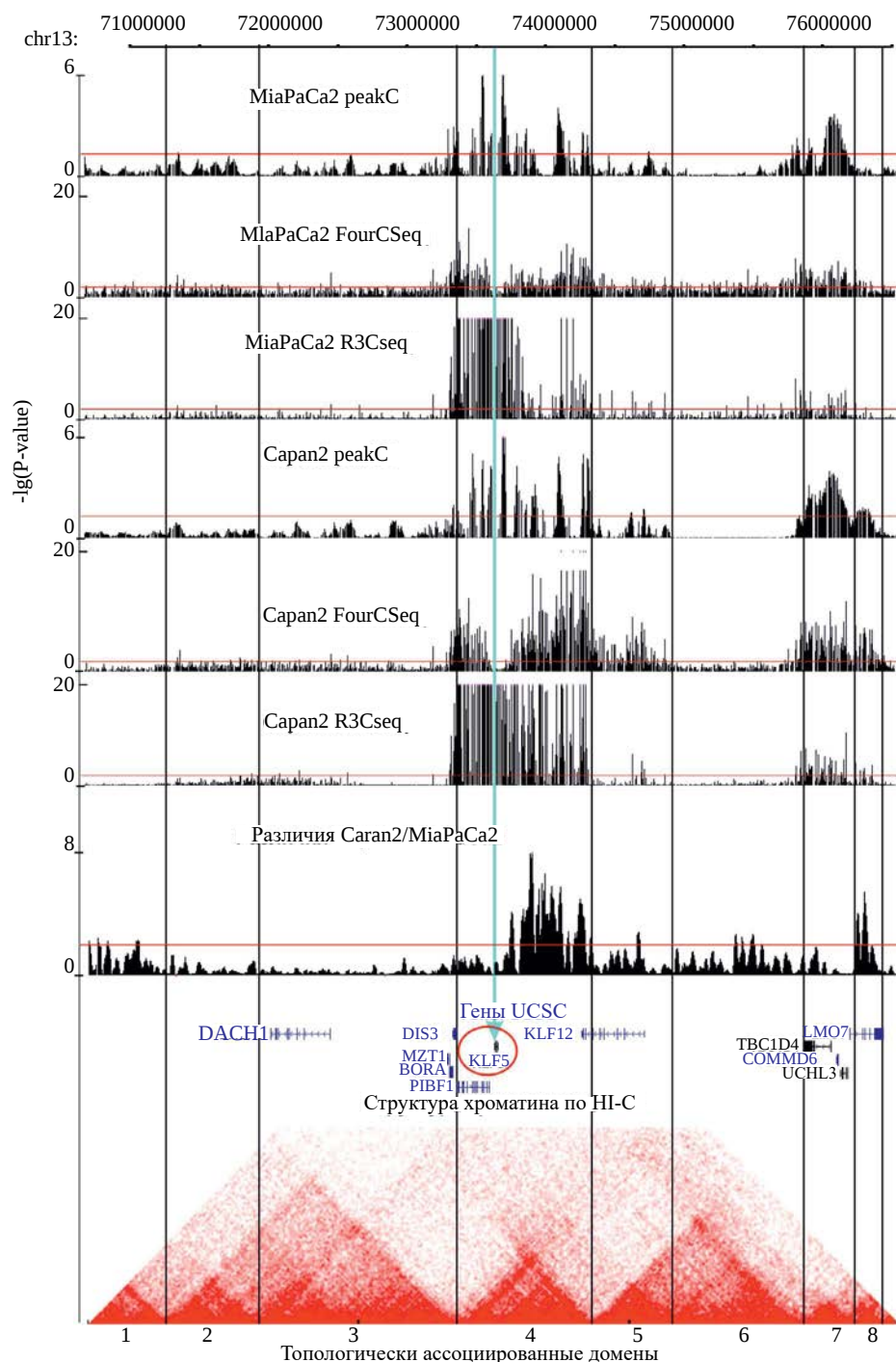
Обращает на себя внимание тот факт, что число идентифицированных контактов промоторной области гена *KLF5* с другими областями исследованного района генома в клетках Saran2, активно экспрессирующих этот ген, значительно (108/69) превышает количество контактов в клетках MIA PaCa2.

**Дифференциальные контакты.** Распределение различий в контактах в исследуемой области клеток Saran2 и MIA PaCa2 представлено на рис. 2 в виде распределения значений  $-\lg(P\text{-value})$ . Различия считали значимыми в тех случаях, когда наблюдаемое значение *P* было ниже 0.01.

Все отобранные контактирующие области были разделены на три группы — специфичные для клеток Saran2 (с высоким уровнем экспрессии *KLF5*), специфичные для клеток MIA PaCa2 (с низким уровнем экспрессии *KLF5*) и общие для обоих типов клеток (дополнительная табл. S4). Специфичными для клеток Saran2 оказались 66 контактов, для клеток MIA PaCa2 — 27, общими в обоих типах клеток были 42 контакта.

**Расположение контактов относительно TAD.** Как хорошо видно из рис. 2, кластеры контактирующих с якорем *KLF5* участков располагаются в соответствии с TAD (см., например, обзор [5]). Согласно данным, полученным с использованием всех программных пакетов, основная масса контактов, как и ожидалось, располагается внутри TAD4, в котором находится ген *KLF5*. В то же время наблюдается заметная область контактов в TAD7, общая для обоих типов клеток, и две области контактов в TAD5 и TAD8, заметно выраженные только в клетках Saran2. Оставшиеся четыре TAD не содержат последовательностей, контактирующих с *KLF5*. Контактирующие с регуляторной областью *KLF5* участки генома будут рассмотрены более подробно. Таким образом, границы TAD не являются непреодолимыми при организации контактов якорной области с удаленными участками генома, хотя TAD играют определенную роль в ограничении этих контактов.

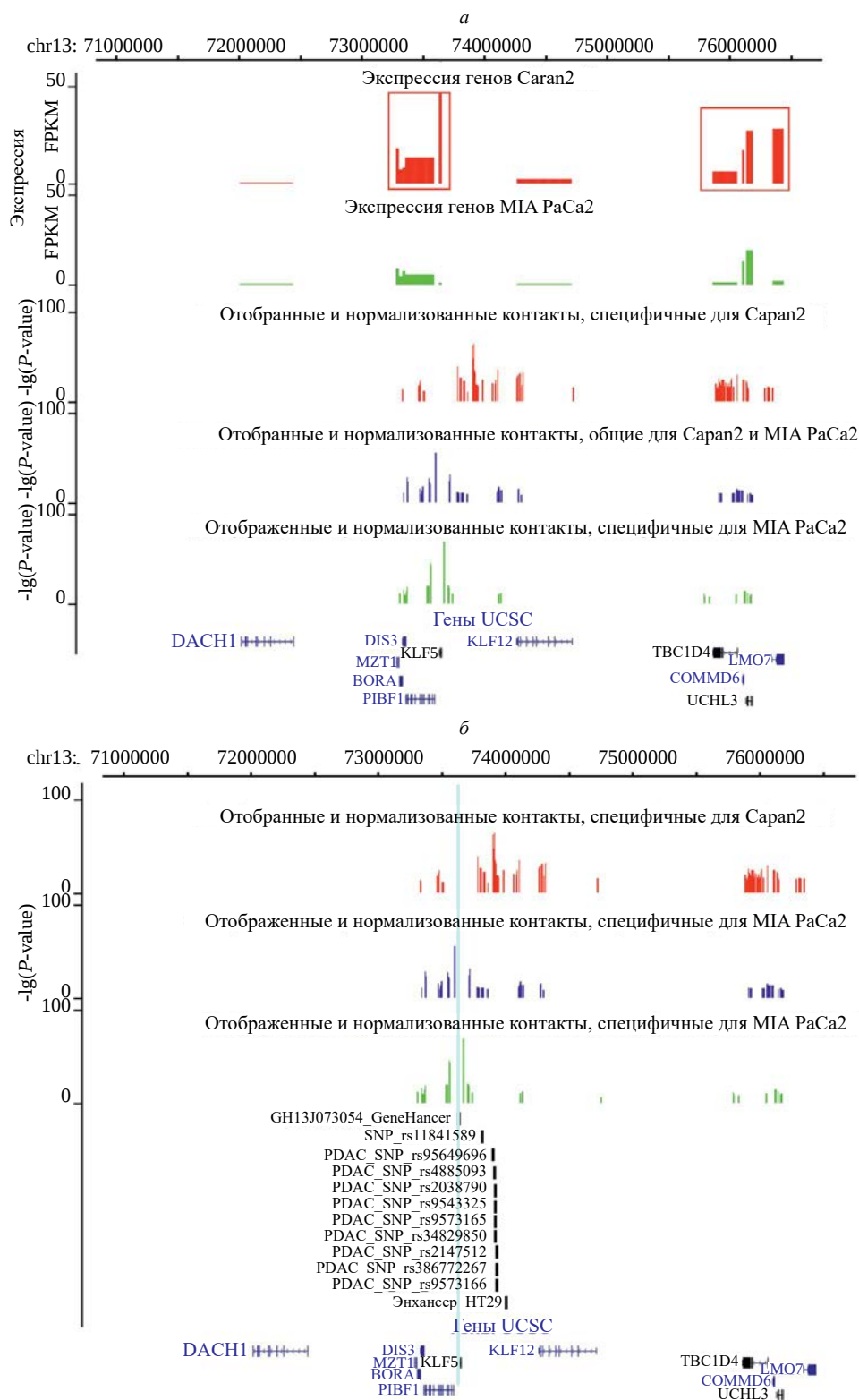
**Контакты и экспрессия генов.** Исследуемый нами участок длиной 6 млн п.н. содержит 10 кодирующих белки генов (не считая *KLF5*), образующих два кластера по четыре гена, еще два гена не входят в кластеры (рис. 3а), а также протяженные участки, не содержащие генов (“генные пустыни”). Из рис. 3а видно, что распределение контактов якорной области *KLF5* в целом соответствует распределению генов — плотность контактов высока в областях высокой плотности генов и, наоборот, контакты практически отсутствуют в “генных пустынях”. Важным исключением является область длиной



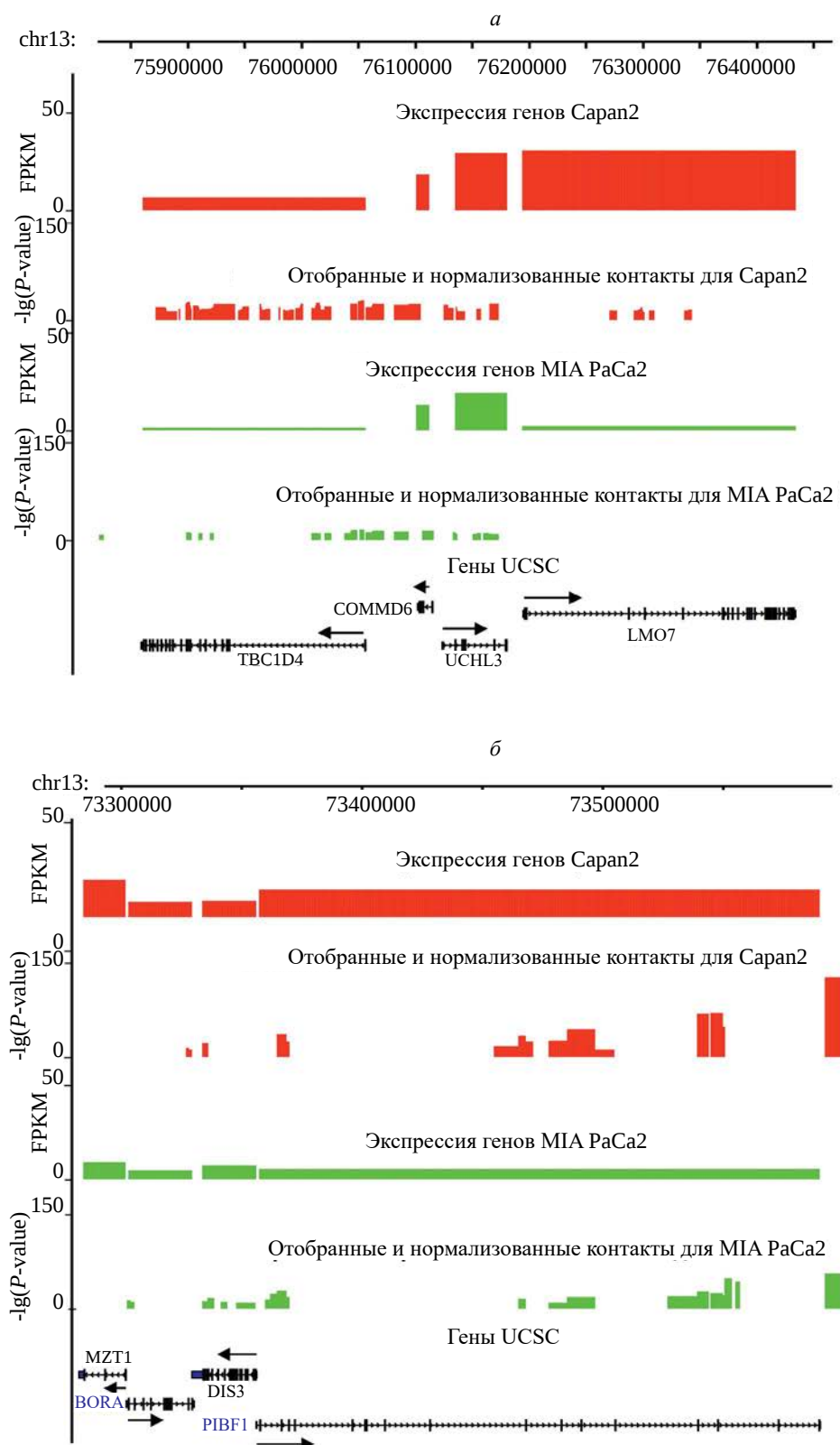
**Рис. 2.** Распределение контактов якорного участка гена *KLF5* в области хромосомы 13 человека размером 6 млн п.н. (по 3 млн п.н. с 5'- и 3'-сторон от якоря). Приведены результаты анализа клеток MIA PaCa2 и Capan2, полученные при помощи программ peakC, FourCSeq и R3Cseq и представленные в виде  $-\lg(P\text{-value})$ . Горизонтальная линия соответствует пороговому  $P$ -значению (0.05 для peakC и 0.01 для FourCseq и R3Cseq). Для дифференциальных контактов, выявленных при помощи программы 4C-ker, пороговое  $P$ -значение составило 0.01. Вертикальная стрелка показывает положение якорной последовательности. Внизу представлено расположение восьми топологически ассоциированных доменов хроматина (Topologically Associating Domains, TAD) согласно данным Hi-C для клеток Capan1 [44].

около 600 т.п.н. между генами *KLF5* и *KLF12*, не содержащая генов, но имеющая большое число контактов, причем преимущественно специфичных для Capan2.

Уровень транскрипции всех генов в клетках Capan2 и MIA PaCa2 (в единицах FPKM по данным RNA-seq [7]) также представлен на рис. 3а, рис. 4 и в табл. 2. Ген *DACH1*, один из



**Рис. 3.** Расположение отобранных и нормализованных участков контакта якорного участка гена *KLF5* в области хромосомы 13 человека размером 6 млн п.н. относительно некоторых функциональных элементов. Отдельно приведены области контактов, специфичные для клеток *Caran2*, *MIA PaCa2*, и общие для обеих линий клеток. *a* – Тканеспецифичность экспрессии генов в клетках *Caran2* и *MIA PaCa2*, связь уровня экспрессии гена и числа его контактов с промоторной областью *KLF5*. По осям ординат отложены значения FPKM для оценки уровня экспрессии генов и  $-\lg(P\text{-value})$  для участков контакта. *б* – Расположение относительно контактов точек однонуклеотидного полиморфизма и делеций/вставок (SNP/indel), ассоциированных с PDAC по данным полногеномного анализа (GWAS, Genome-Wide Association Studies, см. [11, 13]).



**Рис. 4.** Связь уровней экспрессии генов и интенсивности их контактов с якорным участком *KLF5* в двух богатых генами участках хромосомы 13 (обведены квадратами на рис. 3*a*). *a* – Участок с координатами 75 800 000 – 76 500 000 п.н. *б* – Участок с координатами 73280000–73600000 п.н. По осям ординат отложены значения FPKM для оценки уровня экспрессии генов и  $-\lg(P\text{-value})$  для участков контакта. Стрелками указано направление транскрипции генов. Уровни экспрессии генов приведены по данным [7] (доступны в базе данных NCBI GEO, GSE64558). Показаны все контакты, идентифицированные в каждой линии клеток (как специфичные для данной линии клеток, так и общие).

Таблица 2. Транскрипция генов в исследуемой области

| Ген           | Координаты на хромосоме 13 | Транскрипция в клетках линии Саран2, FPKM* | Транскрипция в клетках линии MIA PaCa2, FPKM* |
|---------------|----------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>DACH1</i>  | 72012097–72441330          | 0.223                                      | 0.186                                         |
| <i>MZT1</i>   | 73284460–73301740          | 19.19                                      | 8.89                                          |
| <i>BORA</i>   | 73303079–73329354          | 7.50                                       | 4.53                                          |
| <i>DIS3</i>   | 73333933–73355970          | 8.24                                       | 7.25                                          |
| <i>PIBF1</i>  | 73357608–73590057          | 14.23                                      | 5.33                                          |
| <i>KLF5</i>   | 73636011–73650024          | 98.10                                      | 0.57                                          |
| <i>KLF12</i>  | 74269627–74708066          | 2.26                                       | 0.036                                         |
| <i>TBC1D4</i> | 75860928–76055903          | 6.54                                       | 0.87                                          |
| <i>COMMD6</i> | 76100725–76111941          | 18.35                                      | 12.82                                         |
| <i>UCHL3</i>  | 76134943–76179948          | 28.93                                      | 18.93                                         |
| <i>LMO7</i>   | 76378463–76432149          | 30.12                                      | 1.59                                          |

\* По данным [7].

двух генов, не входящих в кластеры, практически не экспрессируется в обоих типах клеток и не содержит ни одного контакта. Ген *KLF12*, напротив, экспрессируется на заметном уровне в клетках Саран2 и слабо экспрессируется в MIA PaCa2. Соответственно, с этим геном колокализуется значительное число контактов в клетках Саран2 и намного меньшее их число в MIA PaCa2. Возможно, существует прямая корреляция между уровнем экспрессии гена и числом его контактов с промоторной областью *KLF5*, экспрессия которого очень высока в клетках Саран2 и практически отсутствует в MIA PaCa2 (рис. 3а).

Верно ли это предположение для других генов? На рис. 4 представлены в более крупном масштабе два кластера по четыре гена в каждом. На рис. 4а видно, что гены, экспрессия которых в клетках Саран2 заметно выше, чем в MIA PaCa2, характеризуются значительно бóльшим числом колокализованных контактов, специфичных для Саран2. В частности, контакты, специфичные для MIA PaCa2, полностью отсутствуют в области гена *LMO7*. Если же ген экспрессируется в обеих линиях на сходном уровне (*COMMD6*, *UCHL3*), то и число локализованных контактов для них близко. Более сложная картина наблюдается в другом кластере генов (рис. 4б). Если в случае гена *PIBF1* приведенное выше правило выполняется — ген экспрессируется в обеих линиях клеток и содержит близкое число контактов как в Саран2, так и в MIA PaCa2, то подобная картина не наблюдается у трех других генов. В целом, однако, предложенное правило выполняется для семи из 10 генов.

Приведенная выше картина хорошо укладывается в концепцию “транскрипционных фабрик” (transcription factories), то есть внутриядерных частиц размером ~80 нм, содержащих около 10 молекул РНК-полимеразы II и сопутствующие транскрипционные факторы, способных согласованно транскрибировать несколько генов одновременно (см. обзор [40]). Наши данные показывают, что на одной и той же фабрике могут транскрибироваться далеко отстоящие друг от друга в геноме гены, относящиеся к разным TAD, как, например, гены *KLF5* и *LMO7* (TAD 4 и 8, рис. 2).

Таким образом, согласованно экспрессироваться гены могут не только за счет двунаправленного промотора [41], но и находясь на большом удалении друг от друга в геноме в составе одной и той же транскрипционной фабрики. Нельзя также исключить влияния на них одного и того же энхансера *in trans*, как мы предположили ранее [42].

**Контакты и модификации гистонов. Регуляция транскрипции.** Как можно видеть из рис. 5, расположение в исследуемой области меток активного хроматина (H3K27ac, H3K4me3 и H3K4me1) в обеих линиях клеток хорошо согласуется между собой и с расположением активных генов. Также можно видеть, что области высокой плотности модификаций гистона H3 в целом совпадают по положению с областями контактов регуляторной области *KLF5* (как сказано выше, контакты в области, непосредственно примыкающей к гену *KLF5*, исключены нами из рассмотрения). Обратное неверно — имеются протяженные участки, обогащенные контактами, но не содержащие

**Таблица 3.** Регуляторные элементы, потенциально находящиеся в контакте с промоторной областью гена *KLF5*

| Координаты на хромосоме 13   | Функциональные сегменты хроматина* | Модификации гистона H3 | Ген                        | Транскрипция, FPKM (Capan2/MIA PaCa2) |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Специфичные для MIA PaCa2    |                                    |                        |                            |                                       |
| 73302581–73305305            | Промотор                           | +++                    | <i>BORA</i> , интрон 1     | 4.53                                  |
| 73347814–73362175            | Промотор                           | +++                    | <i>DIS3</i> , экзоны 2–7   | 7.25                                  |
| 76106595–76115846            | Промотор                           | +++                    | <i>COMMD6</i> , интрон 1   | 12.8                                  |
| Специфичные для Capan2       |                                    |                        |                            |                                       |
| 73909003–73913511            | PDAC SNP rs4885093                 | ++                     | –                          | –                                     |
| 73918091–73919235            | PDAC SNP rs34829850                | -                      | –                          | –                                     |
| 73924989–73937996            | PDAC SNP rs9573166, rs386772267    | ++                     | –                          | –                                     |
| 74277232–74285530            | Сайт CTCF                          | ++                     | <i>KLF12</i> , интрон 7    | 2.26                                  |
| 74709920–74715862            | Промотор/Энхансер                  | +++                    | <i>KLF12</i> , 5'-область  | -                                     |
| 75989063–75991974            | Энхансер                           | ++                     | <i>TBC1D4</i> , интрон 1   | 6.54                                  |
| 76125003–76128339            | Промотор                           | +++                    | <i>UCHL3</i> , интрон 2    | 28.9                                  |
| 76336300–76342754            | Промотор/Энхансер                  | +++                    | <i>LMO7</i> , интрон 5     | 30.1                                  |
| Общие для Capan2 и MIA PaCa2 |                                    |                        |                            |                                       |
| 74288571–74291701            | Энхансер                           | ++                     | <i>KLF12</i> , интрон 6–7  | 2.26/0.04                             |
| 76056653–76061748            | Промотор                           | +++                    | <i>TBC1D4</i> , 5'-область | -                                     |

\* По [43] либо экспериментально найденные (см. текст).

модифицированного гистона H3. Особенно хорошо это видно на примере клеток MIA PaCa2 (три такие области обведены кружками на рис. 5). Таким образом, указанные выше активирующие модификации гистона H3 (открытый хроматин) не являются необходимыми для образования контактов. Тем не менее в ряде случаев при увеличении числа контактов гена с регуляторной областью *KLF5* в его области появляется или существенно возрастает степень всех трех модификаций гистона H3, что отчетливо видно на примере генов *LMO7* и *KLF12*.

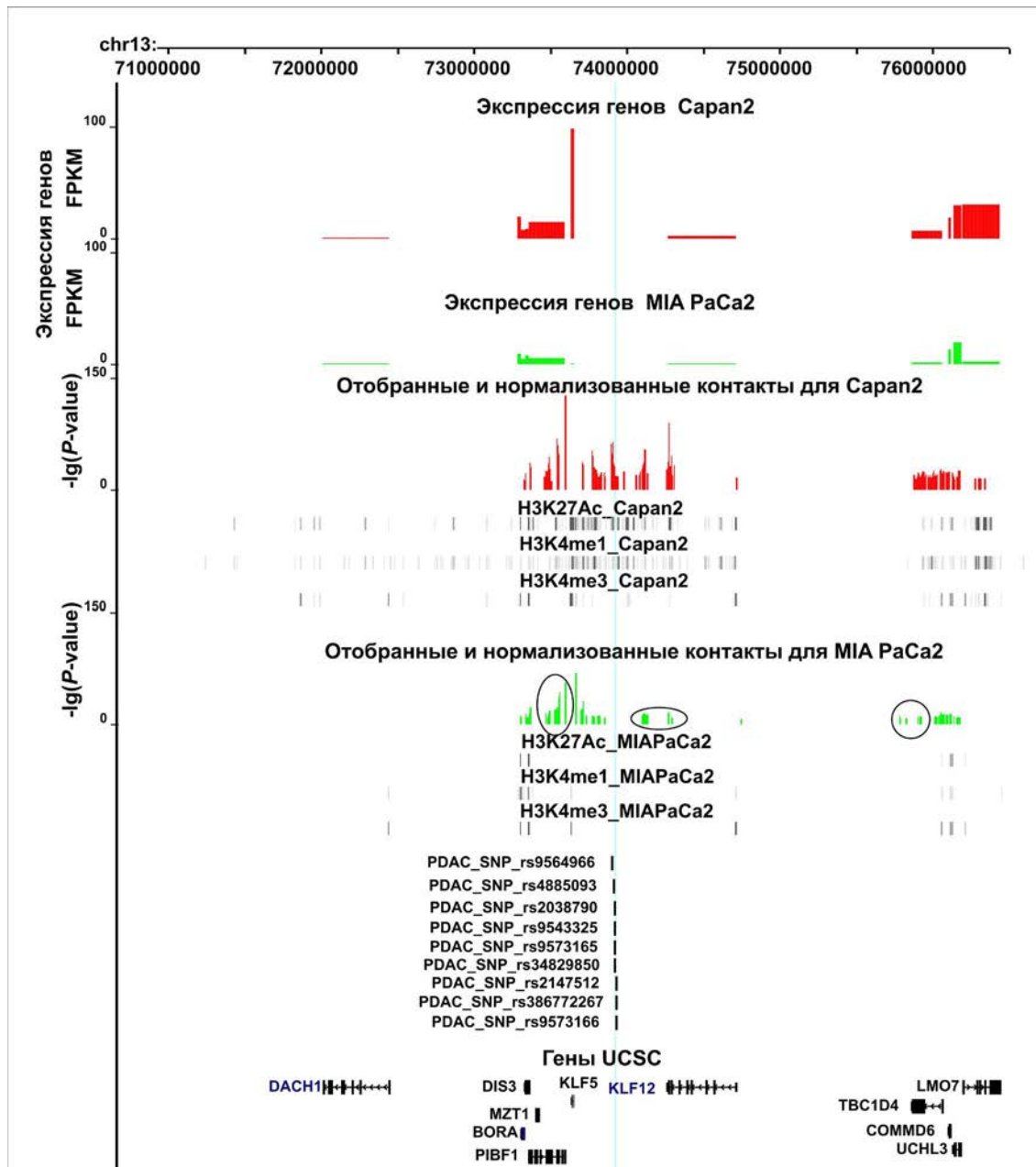
**Контакты и PDAC-ассоциированные SNP.** В ходе полногеномного анализа ассоциаций (GWAS, см. [11–13]) выявлен ряд точек SNP/indel, ассоциированных с PDAC. Эти участки располагаются плотным кластером в небольшой области, расположенной между генами *KLF5* и *KLF12* и характеризующейся также высокой плотностью контактов и модификаций гистона H3, строго специфичных для клеток Capan2. В линии MIA PaCa2 модификации гистона H3 и контакты в этой области полностью отсут-

ствуют (рис. 3б). Можно предположить, что присутствие одного или нескольких SNP мешает образованию контактов, что в свою очередь нарушает регуляцию *KLF5* и корегулируемых генов, что и приводит к прогрессии PDAC.

**Функционально значимые области.** Из областей, контактирующих с промоторной областью гена *KLF5*, отбирали функционально значимые, удовлетворяющие следующим критериям:

- контактирующая область содержит значительный уровень модифицированного гистона H3 (модификации K27Ac, K4me1 и K4me3, характерные для активного хроматина);
- область содержит также либо экспериментально охарактеризованные регуляторные элементы, либо сегменты хроматина с предсказанной функцией по данным [43].

Некоторые функциональные области представлены в табл. 3, полный список всех контактов и их функциональных характеристик приведен в дополнительных табл. S5, S6 и S7.



**Рис. 5.** Распределение геномных контактов якорного участка гена *KLF5* и модификаций гистона H3 в хроматине клеток Capan2 и MIA PaCa2 (доступны в базе данных NCBI GEO, GSE64560) в области хромосомы 13 длиной 6 млн п.н. По осям ординат отложены значения FPKM для оценки уровня экспрессии генов и  $-\lg(P\text{-value})$  для участков контакта. Уровни экспрессии генов приведены по данным [7] (доступны в базе данных NCBI GEO, GSE64560). Показаны все контакты, идентифицированные в каждой линии клеток (как специфичные для данной линии клеток, так и общие).

Одна из функциональных областей контакта, специфичная для клеток MIA PaCa2, располагается вблизи точек начала транскрипции генов *MZT1* и *BORA*, транскрибирующихся в противоположных направлениях, и обладает свойствами потенциального промотора. Возможно, она является промотором одного из этих генов, либо общим для них двунаправленным промотором. Оба этих гена экспрессируются как в клетках

Capan2, так и в MIA PaCa2 на достаточно высоком уровне (табл. 3). Два других потенциальных промотора располагаются в 5'-кодирующих областях генов *DIS3* и *COMMD6*.

Специфичная для клеток Capan2 область длиной около 40 т.п.н. содержит группу SNP, ассоциированных с PDAC (рассмотрена выше). Кроме того, для Capan2 специфичны две области контакта со свойствами промотора. Одна из них

(74709920–74715862) расположена вблизи точки начала транскрипции *KLF12*, другая – во втором интроне (и вблизи точки начала транскрипции) *UCHL3*. При этом *KLF5* экспрессируется преимущественно в Саран2, а *UCHL3* – в обеих линиях клеток. Также для Саран2 специфичны сайт связывания фактора транскрипции CTCF (потенциальный инсультатор) в интроне 7 гена *KLF12* и две области контакта со свойствами энхансера, расположенные в интроне 1 гена *TBC1D4* и интроне 5 гена *LMO7*. Эти два элемента можно рассматривать как кандидаты на роль энхансера *KLF5* в этих клетках.

Общим для двух линий клеток оказался контакт со свойствами промотора, расположенный вблизи точки начала транскрипции гена *TBC1D4*; при этом в клетках Саран2 ген экспрессируется намного сильнее, возможно, за счет описанного в предыдущем абзаце энхансера. Область контакта, расположенная вблизи 3'-конца гена *KLF12*, также обладает свойствами потенциального энхансера.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ. РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ САРАН2 И MIA PACA2

Из полученных нами и уже опубликованных данных можно сделать следующие заключения о различиях в структуре и регуляции гена *KLF5* и окружающего этот ген хроматина в клетках линии Саран2 (низкоккачественные высокодифференцированные, высокая экспрессия *KLF5*) и линии MIA PaCa2 (высококкачественные и низкодифференцированные, низкая экспрессия *KLF5*):

– число и распределение контактов регуляторной области *KLF5* с другими областями хроматина в этих типах клеток существенно различаются (рис. 2) – в линии Саран2 число контактов значительно выше;

– в линии Саран2 интенсивность активирующих хроматин модификаций гистона H3 в исследованной области значительно выше, чем в MIA PaCa2. Этому соответствует и повышенный в клетках Саран2 уровень экспрессии большинства генов этой области;

– существует корреляция между уровнем экспрессии генов и интенсивностью их контактов с регуляторной областью *KLF5*, что указывает на согласованность их экспрессии, возможно, в рамках транскрипционной фабрики;

– только для клеток линии Саран2 характерен высокий уровень контактов регуляторной области *KLF5* со свободным от генов участком генома, содержащим кластер ассоциированных с PDAC SNP.

Таким образом, в рамках использованной модели при повышении степени злокачественности клеток в исследованной области уменьшается общее число контактов промоторной области гена *KLF5*, понижается степень модификации гистона H3, характерных для активного хроматина, и уровень экспрессии большинства генов. Для подтверждения этих выводов требуется проведение экспериментов на большем числе клеточных линий.

Настоящая работа финансировалась за счет средств бюджета Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Дополнительные материалы.** Дополнительная информация размещена в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Zinovyeva\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Zinovyeva_rus.zip).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collisson E.A., Bailey P., Chang D.K., Biankin A.V. (2019) Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 207–220.
2. Rawla P., Sunkara T., Gaduputi V. (2019) Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World J. Oncol.* **10**, 10–27.
3. Kung H.C., Yu J. (2023) Targeted therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma: mechanisms and clinical study. *MedComm.* (2020). **4**, e216.
4. Pandey S., Gupta V.K., Lavania S.P. (2023) Role of epigenetics in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Epigenomics.* **15**, 89–110.
5. Hafner A., Boettiger A. 2023. The spatial organization of transcriptional control. *Nat. Rev. Genet.* **24**, 53–68.
6. van Roey R., Brabletz T., Stemmler M.P., Armstark I. (2021) Dereglulation of transcription factor networks driving cell plasticity and metastasis in pancreatic cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 753456.
7. Diaferia G.R., Balestrieri C., Prosperini E., Nicoli P., Spaggiari P., Zerbi A., Natoli G. (2016) Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer. *EMBO J.* **35**, 595–617.
8. Абжалимов И.Р., Зиновьева М.В., Николаев Л.Г., Копанцева М.Р., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д. (2017) Экспрессия генов транскрипционных

- факторов в линиях клеток, соответствующих разным стадиям прогрессии рака поджелудочной железы. *Докл. РАН*. **475**, 333–335.
9. Luo Y., Chen C. (2021) The roles and regulation of the KLF5 transcription factor in cancers. *Cancer Sci.* **112**, 2097–2117.
  10. Зиновьева М.В., Костина М.Б., Чернов И.П., Кондратьева Л.Г., Свердлов Е.Д. (2016) KLF5, новый игрок и новая мишень в постоянно меняющемся составе молекулярных двигателей рака поджелудочной железы. *Биоорганическая химия*. **42**, 668–674.
  11. Hoskins J.W., Ibrahim A., Emmanuel M.A., Man-  
miller S.M., Wu Y., O'Neill M., Jia J., Collins I.,  
Zhang M., Thomas J.V., Rost L.M., Das S., Parikh H.,  
Haake J.M., Matters G.L., Kurtz R.C., Bamlet W.R.,  
Klein A., Stolzenberg-Solomon R., Wolpin B.M.,  
Yarden R., Wang Z., Smith J., Olson S.H., Andres-  
son T., Petersen G.M., Amundadottir L.T. (2016)  
Functional characterization of a chr13q22.1 pan-  
creatic cancer risk locus reveals long-range interaction  
and allele-specific effects on DIS3 expression. *Hum.*  
*Mol. Genet.* **25**, 4726–4738.
  12. Wolpin B.M., Rizzato C., Kraft P., Kooperberg C.,  
Petersen G.M., Wang Z., Arslan A.A., Beane-Free-  
man L., Bracci P.M., Buring J., Canzian F., Du-  
ell E.J., Gallinger S., Giles G.G., Goodman G.E.,  
Goodman P.J., Jacobs E.J., Kamineni A., Klein A.P.,  
Kolonel L.N., Kulke M.H., Li D., Malats N., Ol-  
son S.H., Risch H.A., Sesso H.D., Visvanathan K.,  
White E., Zheng W., Abnet C.C., Albanes D., An-  
dreotti G., Austin M.A., Barfield R., Basso D., Ber-  
ndt S.I., Boutron-Ruault M.C., Brozman M., Bu-  
chler M.W., Bueno-de-Mesquita H.B., Bugert P.,  
Burdette L., Campa D., Caporaso N.E., Capurso G.,  
Chung C., Cotterchio M., Costello E., Elena J., Fu-  
nel N., Gaziano J.M., Giese N.A., Giovannucci E.L.,  
Goggins M., Gorman M.J., Gross M., Haiman  
C.A., Hassan M., Helzlsouer K.J., Henderson B.E.,  
Holly E.A., Hu N., Hunter D.J., Innocenti F., Jen-  
ab M., Kaaks R., Key T.J., Khaw K.T., Klein E.A.,  
Kogevinas M., Krogh V., Kupcinskas J., Kurtz R.C.,  
LaCroix A., Landi M.T., Landi S., Le March-  
and L., Mambrini A., Mannisto S., Milne R.L.,  
Nakamura Y., Oberg A.L., Owzar K., Patel A.V.,  
Peeters P.H., Peters U., Pezzilli R., Piepoli A., Por-  
ta M., Real F.X., Riboli E., Rothman N., Scarpa A.,  
Shu X.O., Silverman D.T., Soucek P., Sund M.,  
Talar-Wojnarowska R., Taylor P.R., Theodoropou-  
los G.E., Thornquist M., Tjonneland A., Tobias G.S.,  
Trichopoulos D., Vodicka P., Wactawski-Wende J.,  
Wentzensen N., Wu C., Yu H., Yu K., Zeleni-  
uch-Jacquotte A., Hoover R., Hartge P., Fuchs C.,  
Chanock S.J., Stolzenberg-Solomon R.S., Amun-  
dadottir L.T. (2014) Genome-wide association study  
identifies multiple susceptibility loci for pancreatic  
cancer. *Nat. Genet.* **46**, 994–1000.
  13. Petersen G.M., Amundadottir L., Fuchs C.S.,  
Kraft P., Stolzenberg-Solomon R.Z., Jacobs K.B.,  
Arslan A.A., Bueno-de-Mesquita H.B., Gallinger S.,  
Gross M., Helzlsouer K., Holly E.A., Jacobs E.J.,  
Klein A.P., LaCroix A., Li D., Mandelson M.T.,  
Olson S.H., Risch H.A., Zheng W., Albanes D.,  
Bamlet W.R., Berg C.D., Boutron-Ruault M.C.,  
Buring J.E., Bracci P.M., Canzian F., Clipp S.,  
Cotterchio M., de Andrade M., Duell E.J., Ga-  
ziano J.M., Giovannucci E.L., Goggins M., Hall-  
mans G., Hankinson S.E., Hassan M., Howard B.,  
Hunter D.J., Hutchinson A., Jenab M., Kaaks R.,  
Kooperberg C., Krogh V., Kurtz R.C., Lynch S.M.,  
McWilliams R.R., Mendelsohn J.B., Michaud D.S.,  
Parikh H., Patel A.V., Peeters P.H., Rajkovic A.,  
Riboli E., Rodriguez L., Seminara D., Shu X.O.,  
Thomas G., Tjonneland A., Tobias G.S., Trichopou-  
los D., Van Den Eeden S.K., Virtamo J., Wactawski-  
Wende J., Wang Z., Wolpin B.M., Yu H., Yu K., Zele-  
niuch-Jacquotte A., Fraumeni J.F., Jr., Hoover R.N.,  
Hartge P., Chanock S.J. (2010) A genome-wide asso-  
ciation study identifies pancreatic cancer susceptibili-  
ty loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33.  
*Nat. Genet.* **42**, 224–228.
  14. Zhang Y., Yao C., Ju Z., Jiao D., Hu D., Qi L.,  
Liu S., Wu X., Zhao C. (2023) Kruppel-like factors in  
tumors: key regulators and therapeutic avenues. *Front.*  
*Oncol.* **13**, 1080720.
  15. Palioura D., Lazou A., Drosatos K. (2022) Krup-  
pel-like factor (KLF)5: an emerging foe of cardiovas-  
cular health. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **163**, 56–66.
  16. Li J., Liu L., Zhou W.Q., Cai L., Xu Z.G., Rane M.J.  
(2021) Roles of Kruppel-like factor 5 in kidney dis-  
ease. *J. Cell. Mol. Med.* **25**, 2342–2355.
  17. He P., Yang J.W., Yang V.W., Bialkowska A.B. (2018)  
Kruppel-like factor 5, increased in pancreatic duc-  
tal adenocarcinoma, promotes proliferation, acinar-  
to-ductal metaplasia, pancreatic intraepithelial  
neoplasia, and tumor growth in mice. *Gastroentero-  
logy*. **154**, 1494–1508 e1413.
  18. van de Werken H.J., de Vree P.J., Splinter E., Holw-  
erda S.J., Klous P., de Wit E., de Laat W. (2012) 4C  
technology: protocols and data analysis. *Meth. Enzy-  
mol.* **513**, 89–112.
  19. Mihara N., Chiba T., Yamaguchi K., Sudo H.,  
Yagishita H., Imai K. (2017) Minimal essential region  
for kruppel-like factor 5 expression and the regulation  
by specificity protein 3-GC box binding. *Gene*. **601**,  
36–43.
  20. Shen W., Le S., Li Y., Hu F. (2016) SeqKit: a  
cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file  
manipulation. *PLoS One*. **11**, e0163962.
  21. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L.  
(2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of  
short DNA sequences to the human genome. *Genome*  
*Biol.* **10**, R25.
  22. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J.,  
Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. (2009)  
The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.  
*Bioinformatics*. **25**, 2078–2079.
  23. Thongjuea S., Stadhouders R., Grosveld F.G., Sol-  
er E., Lenhard B. (2013) r3Cseq: an R/Bioconduc-  
tor package for the discovery of long-range genomic

- interactions from chromosome conformation capture and next-generation sequencing data. *Nucl. Acids Res.* **41**, e132.
24. Klein F.A., Pakozdi T., Anders S., Ghavi-Helm Y., Furlong E.E., Huber W. (2015) FourCSeq: analysis of 4C sequencing data. *Bioinformatics.* **31**, 3085–3091.
  25. Geeven G., Teunissen H., de Laat W., de Wit E. (2018) peakC: a flexible, non-parametric peak calling package for 4C and Capture-C data. *Nucl. Acids Res.* **46**, e91.
  26. Raviram R., Rocha P.P., Muller C.L., Miraldi E.R., Badri S., Fu Y., Swanzey E., Proudhou C., Snetkova V., Bonneau R., Skok J.A. (2016) 4C-ker: a method to reproducibly identify genome-wide interactions captured by 4C-Seq experiments. *PLoS Comput. Biol.* **12**, e1004780.
  27. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* **12**, 996–1006.
  28. Lee B.T., Barber G.P., Benet-Pages A., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Fischer C., Gonzalez J.N., Hinrichs A.S., Lee C.M., Muthuraman P., Nassar L.R., Nguy B., Pereira T., Perez G., Raney B.J., Rosenbloom K.R., Schmelter D., Speir M.L., Wick B.D., Zweig A.S., Haussler D., Kuhn R.M., Haeussler M., Kent W.J. (2022) The UCSC Genome Browser database: 2022 update. *Nucl. Acids Res.* **50**, D1115–D1122.
  29. Moore J.E., Purcaro M.J., Pratt H.E., Epstein C.B., Shores N., Adrian J., Kawli T., Davis C.A., Dobin A., Kaul R., Halow J., Van Nostrand E.L., Freese P., Gorkin D.U., Shen Y., He Y., Mackiewicz M., Pauli-Behn F., Williams B.A., Mortazavi A., Keller C.A., Zhang X.O., Elhajjajy S.I., Huey J., Dickel D.E., Snetkova V., Wei X., Wang X., Rivera-Mulia J.C., Rozowsky J., Zhang J., Chhetri S.B., Victorson A., White K.P., Visel A., Yeo G.W., Burge C.B., Lecuyer E., Gilbert D.M., Dekker J., Rinn J., Mendenhall E.M., Ecker J.R., Kellis M., Klein R.J., Noble W.S., Kundaje A., Guigo R., Farnham P.J., Cherry J.M., Myers R.M., Ren B., Graveley B.R., Gerstein M.B., Pennacchio L.A., Snyder M.P., Bernstein B.E., Wold B., Hardison R.C., Gingeras T.R., Stamatoyannopoulos J.A., Weng Z. (2020) Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature.* **583**, 699–710.
  30. Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P., Evangelista C., Kim I.F., Tomashevsky M., Marshall K.A., Phillippy K.H., Sherman P.M., Holko M., Yefanov A., Lee H., Zhang N., Robertson C.L., Serova N., Davis S., Soboleva A. (2013) NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucl. Acids Res.* **41**, D991–995.
  31. Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I., Zimmerman S., Twik M., Fishilevich S., Stein T.I., Nudel R., Lieder I., Mazor Y., Kaplan S., Dahary D., Warshawsky D., Guan-Golan Y., Kohn A., Rappaport N., Safran M., Lancet D. (2016) The GeneCards Suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **54**, 1.30.1–1.30.33.
  32. Collisson E.A., Sadanandam A., Olson P., Gibb W.J., Truitt M., Gu S., Cooc J., Weinkle J., Kim G.E., Jakkula L., Feiler H.S., Ko A.H., Olshen A.B., Danenberg K.L., Tempero M.A., Spellman P.T., Hanahan D., Gray J.W. (2011) Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.* **17**, 500–503.
  33. Kawai-Kowase K., Kurabayashi M., Hoshino Y., Ohyama Y., Nagai R. (1999) Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **85**, 787–795.
  34. Chen C., Zhou Y., Zhou Z., Sun X., Otto K.B., Uht R.M., Dong J.T. (2004) Regulation of KLF5 involves the Sp1 transcription factor in human epithelial cells. *Gene.* **330**, 133–142.
  35. Takeda T., Yokoyama Y., Takahashi H., Okuzaki D., Asai K., Itakura H., Miyoshi N., Kobayashi S., Uemura M., Fujita T., Ueno H., Mori M., Doki Y., Fujii H., Eguchi H., Yamamoto H. (2022) A stem cell marker KLF5 regulates CCAT1 via three-dimensional genome structure in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer.* **126**, 109–119.
  36. Koutsi M.A., Poulidou M., Champezo L., Vatsellas G., Giannopoulou A.I., Piperi C., Agelopoulos M. (2022) Typical enhancers, super-enhancers, and cancers. *Cancers (Basel).* **14**, 4375.
  37. Chen L., Huang M., Plummer J., Pan J., Jiang Y.Y., Yang Q., Silva T.C., Gull N., Chen S., Ding L.W., An O., Yang H., Cheng Y., Said J.W., Doan N., Dinjens W.N., Waters K.M., Tuli R., Gayther S.A., Klempner S.J., Berman B.P., Meltzer S.J., Lin D.C., Koeffler H.P. (2020) Master transcription factors form interconnected circuitry and orchestrate transcriptional networks in oesophageal adenocarcinoma. *Gut.* **69**, 630–640.
  38. Jiang Y.Y., Jiang Y., Li C.Q., Zhang Y., Dakle P., Kaur H., Deng J.W., Lin R.Y., Han L., Xie J.J., Yan Y., Doan N., Zheng Y., Mayakonda A., Hazawa M., Xu L., Li Y., Aswad L., Jeitany M., Kanojia D., Guan X.Y., Said J.W., Yang W., Fullwood M.J., Lin D.C., Koeffler H.P. (2020) TP63, SOX2, and KLF5 establish a core regulatory circuitry that controls epigenetic and transcription patterns in esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Gastroenterology.* **159**, 1311–1327 e1319.
  39. Chen C.H., Yang N., Zhang Y., Ding J., Zhang W., Liu R., Liu W., Chen C. (2019) Inhibition of super enhancer downregulates the expression of KLF5 in basal-like breast cancers. *Int. J. Biol. Sci.* **15**, 1733–1742.
  40. Kimura H., Sato Y. (2022) Imaging transcription elongation dynamics by new technologies unveils the organization of initiation and elongation in transcription factories. *Curr. Opin. Cell Biol.* **74**, 71–79.

41. Didych D.A., Shamsutdinov M.F., Smirnov N.A., Akopov S.B., Monastyrskaya G.S., Uspenskaya N.Y., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. (2013) Human *PSENEN* and *U2AF1L4* genes are concertedly regulated by a genuine bidirectional promoter. *Gene*. **515**, 34–41.
42. Smirnov N.A., Akopov S.B., Didych D.A., Nikolaev L.G. (2017) *In trans* promoter activation by enhancers in transient transfection. *Gene*. **603**, 15–20.
43. Hoffman M.M., Ernst J., Wilder S.P., Kundaje A., Harris R.S., Libbrecht M., Giardine B., Ellenbogen P.M., Bilmes J.A., Birney E., Hardison R.C., Duham I., Kellis M., Noble W.S. (2013) Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucl. Acids Res.* **41**, 827–841.
44. Xu Z., Lee D.S., Chandran S., Le V.T., Bump R., Yasis J., Dallarda S., Marcotte S., Clock B., Haghani N., Cho C.Y., Akdemir K.C., Tyndale S., Futreal P.A., McVicker G., Wahl G.M., Dixon J.R. (2022) Structural variants drive context-dependent oncogene activation in cancer. *Nature*. **612**, 564–572.

## Spatial Organization of Chromatin of *KLF5* Gene Promoter Region in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

M. V. Zinovyeva<sup>1</sup>, L. G. Nikolaev<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

\*e-mails: lev@ibch.ru, kinvel@gmail.com

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is characterized by a poor prognosis and is poorly amenable to modern therapies. A range of cell cultures reflecting different degrees of tumor differentiation and malignancy can serve as a model of PDAC development. Highly differentiated low malignant cells are characterized by increased expression of the *KLF5* gene. The *KLF5* protein is a vivid representative of multifunctional transcription factors, and its involvement in a variety of cellular processes, particularly in the pathology of various cancers, has been demonstrated. We investigated the spatial organization of chromatin of regulatory regions of *KLF5* gene using highly differentiated Capan2 cells PDAC with a high level of *KLF5* expression and poorly differentiated MIA PaCa2 PDAC cells with a low level of this gene expression by circular chromosome conformation capture (4C-seq). It was shown that the number and distribution of contacts of the *KLF5* regulatory region with other chromatin regions are significantly different for these cell types; the number of contacts is significantly higher for Capan2 cells. There is a correlation between the expression level of genes close to *KLF5* and the intensity of their sequence contacts with the *KLF5* regulatory region, indicating that their expression is coordinated, possibly within the transcriptional factory. Only Capan2 is characterized by a high level of contacts of the *KLF5* regulatory region with the gene free region containing a cluster of PDAC-associated single nucleotide polymorphisms (SNP). Thus, the total number of contacts of the promoter region of the *KLF5* gene and the expression level of most of the surrounding *KLF5* genes decrease as the grade of cell malignancy increases.

**Keywords:** pancreatic ductal adenocarcinoma, *KLF5*, chromatin, spatial organization, transcription regulation

УДК 576.321

## GRIP1 ВОВЛЕЧЕН ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИМЕНТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ С ФОКАЛЬНЫМИ КОНТАКТАМИ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2024 г. Ф. К. Гюева<sup>a, \*</sup><sup>a</sup>Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290 Россия

\*e-mail: fguyeva@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2023 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 12.03.2024 г.

Виментиновые промежуточные филаменты — динамичные цитоскелетные структуры, способные перемещаться в цитоплазме благодаря активности моторных белков — кинезина-1 и цитоплазматического динеина. Как именно моторные белки взаимодействуют с виментиновыми филаментами, неизвестно. В этой работе показано, что белок GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein), известный как адаптер кинезина-1 на многих карго в нервных клетках, может опосредовать также связывание кинезина-1 с виментиновыми филаментами. GRIP1 ассоциирован с виментиновыми филаментами в различных клетках и иммунопреципитируется с виментином из клеточного лизата. Эндотелиальные клетки человека с нокаутом гена белка GRIP1 теряют фокальные контакты и меняют адгезивные свойства. Предложена гипотеза, согласно которой кинезин-1 с помощью адаптера GRIP1 доставляет виментиновые филаменты на периферию клетки для стабилизации фокальных контактов.

**Ключевые слова:** белок GRIP1, кинезин-1, виментиновые промежуточные филаменты, фокальные контакты

DOI: 10.31857/S0026898424050076, EDN: HUNTKB

### ВВЕДЕНИЕ

Виментиновые промежуточные филаменты — динамичные цитоскелетные структуры, положение и перемещение которых в цитоплазме зависит от микротрубочек и моторного белка кинезина-1 (далее просто кинезин) [1]. Деполимеризация микротрубочек [2], а также ингибирование кинезина [3] или нокаут генов его моторной тяжелой цепи [4] вызывают обратимую агрегацию виментиновых филаментов (ВФ) в околоядерной области, зависящую от АТФ и актиновых филаментов [5]. Кинезин — универсальный моторный белок,

который осуществляет транспорт разнообразных карго, а его активность в каждом отдельном случае определяется связанным с карго адаптерным (scaffolding) белком [6]. Адаптерный белок, опосредующий связывание кинезина с ВФ, неизвестен.

Детальное изучение процесса агрегации ВФ показало, что от основной массы агрегирующих филаментов отстают отдельные филаменты виментина, которые оказываются связанными с фокальными контактами (ФК) на периферии клетки [7]. Фокальные комплексы и более зрелые ФК играют важную роль в прикреплении и распластывании клетки и ее перемещении по субстрату. С участием интегринов устанавливается связь внеклеточного матрикса с цитоскелетом и рекрутируется комплекс сигнальных и адаптерных белков, чувствительный к внешним условиям [8]. Так, например, поток жидкости вдоль клеточной мембраны индуцирует реорганизацию ФК в клетках эндотелия [9]. Другим примером могут служить гладкомышечные клетки, в которых в ответ на механическое натяжение, имити-

Сокращения: GRIP — белок, взаимодействующий с рецептором глутамата (Glutamate Receptor Interacting Protein); ВФ — виментиновые филаменты; ФК — фокальные контакты; GBD — GRIP-связывающий домен (GRIP-Binding Domain); PDZ — общий структурный домен из 80–90 аминокислотных остатков, обнаруженный в сигнальных белках бактерий, дрожжей, растений, вирусов и животных (Postsynaptic density-95/Discs large/Zona occludens-1); AMPA —  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота.

рующее повышенное давление крови в сосуде, один из компонентов ФК, зиксин, мигрирует в ядро и выполняет там роль транскрипционно-го фактора [10].

Изменения в ФК передаются на элементы цитоскелета и корректируют поведение клетки, а воспринимающий сигналы цитоскелет, в свою очередь, влияет на структуру и функционирование ФК. Наиболее тесно с ФК связаны актомиозиновые стресс-фибриллы, вместе они обеспечивают чувствительность клетки к механическим воздействиям и согласованное направленное перемещение клетки в пространстве [11]. По микротрубочкам осуществляется транспорт различных карго к ФК, их функция необходима для обмена компонентов ФК и для внутриклеточной передачи сигналов [12]. Наконец, промежуточные филаменты, в частности ВФ, участвуют в стабилизации этих структур: ассоциация с ВФ замедляет обмен белков в ФК [13], а вызванный РНК-интерференцией нокдаун виментина, напротив, приводит к их частичной разборке [9].

Механизм влияния ВФ на ФК не установлен. Есть несколько кандидатов на роль посредника, обеспечивающего их взаимодействие. Прежде всего, сам виментин способен прямо связываться с  $\beta 3$ -интегрином, и эта изоформа интегрин, по-видимому, удерживает ВФ на периферии, поскольку в отсутствие  $\beta 3$ -интегрин они агрегируют [14]. Распределение ВФ контролируется также ассоциированным с ФК адаптерным белком Нис5, нокаут гена которого вызывает их коллапс [15]. Наконец, одна из изоформ цитоплазматического плектина (P1f) локализуется на зрелых ФК в фибробластах и обеспечивает рекрутирование предшественников и сборку на них ВФ, обеспечивая тем самым их связь [16].

Как и повсюду в цитоплазме, точная доставка виментиновых полимеров к ФК зависит от микротрубочек и кинезина. Предполагается, что роль адаптера в этом процессе может играть белок GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1). Для такого предположения есть следующие основания: во-первых, GRIP1 напрямую связывается с тяжелой цепью кинезина [17]; во-вторых, GRIP1 участвует в доставке разнообразных карго; в-третьих, GRIP1 взаимодействует с некоторыми белками, входящими в состав фокальных комплексов — с зиксином [18] и тестином [19] (показано с использованием дигибридного анализа), а также с белком TRIP6 [20] и  $\alpha$ -липринами [21], что продемонстрировано биохимическими методами.

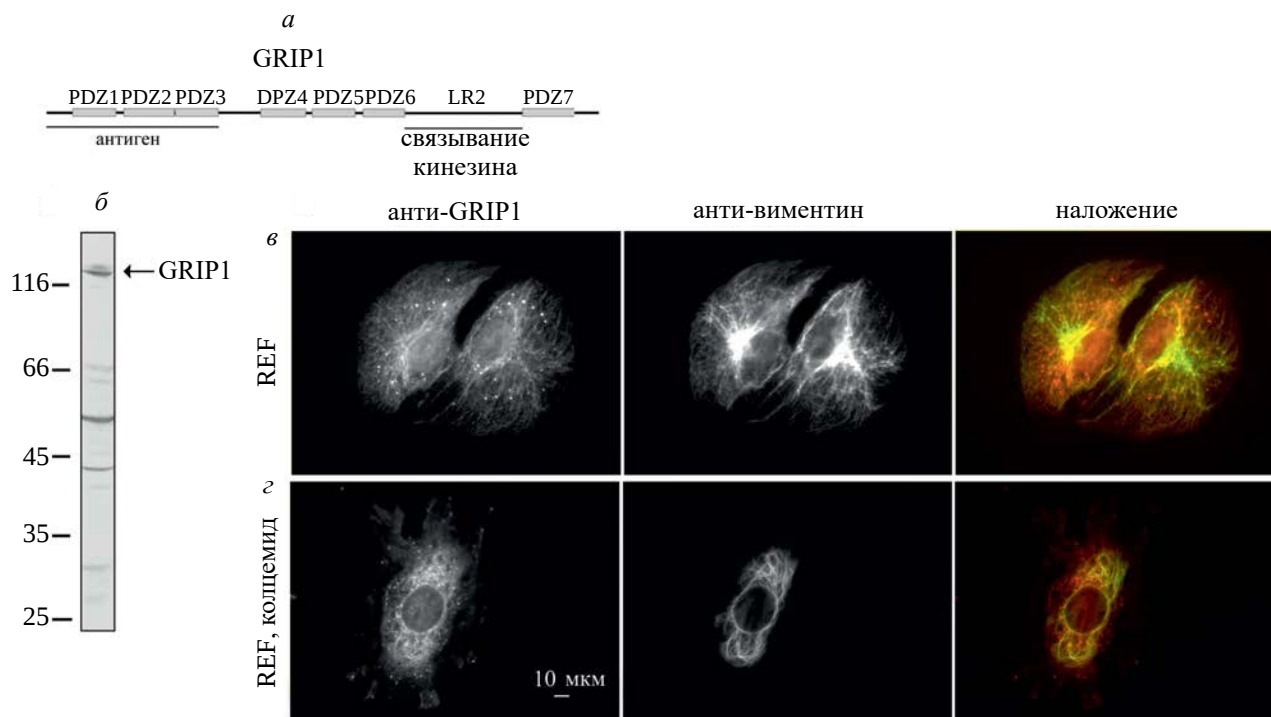
В дополнение к этим данным в экспериментах на животных с инактивированным геном белка GRIP1 показано, что GRIP1 играет важную

роль в прикреплении клеток к внеклеточному матриксу. Так, нокаут гена *GRIP1* вызывал у мышей развитие синдрома Фрейзера, при котором нарушается связь между GRIP1 и Fras1 — белком внеклеточного матрикса, вовлеченным в регуляцию адгезии эпидермиса к базальной мембране [22]. Кроме того, из-за нарушения адгезии тромбоцитов к эндотелию у таких мышей задерживается образование кровяного сгустка [23].

GRIP1 — это белок с молекулярной массой около 130 кДа, содержащий семь PDZ-доменов (рис. 1а), благодаря которым он способен одновременно связываться с разными партнерами и организовывать многокомпонентные комплексы. Главным компонентом этих комплексов, помимо самого GRIP1, является моторный белок кинезин, который обеспечивает транспорт по микротрубочкам. Интересно, что GRIP1 взаимодействует не только с кинезином, но и с другим моторным белком — миозином VI [20]. Оба моторных белка связываются с участком LR2 GRIP1 (рис. 1а), и это связывание регулируется фосфорилированием Trp-956 в белке GRIP1. Фосфорилированный GRIP1 освобождается из комплекса с моторным белком посредством какого-либо члена семейства 14-3-3, который вытесняет кинезин или миозин VI из транспортного комплекса [20, 24].

Ген белка GRIP1 экспрессируется в разных клетках и тканях, многие культивируемые линии клеток млекопитающих содержат заметное количество GRIP1. мРНК GRIP1 подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются множественные варианты белка [25], различающиеся свойствами и функциями [26, 27]. Например, один из переменных N-концевых участков определяет, будет ли изоформа модифицирована остатком пальмитиновой кислоты и направлена в дендритные шипики, в то время как немодифицированный белок останется в теле нейрона [28].

Исходно GRIP1 был обнаружен в головном мозге как партнер субъединиц AMPA-рецепторов — трансмембранных белковых комплексов, обеспечивающих передачу нейромедиатора глутаминовой кислоты между возбуждающими нейронами в центральной нервной системе, что нашло отражение в его названии: Glutamate Receptor Interacting Protein [29]. Позже оказалось, что GRIP1 способен по отдельности связывать целый ряд белков, вовлеченных в функционирование AMPA-рецепторов на разных его этапах [30–37]. В этом процессе участвует и миозин VI, вовлеченный в эндоцитоз AMPA-рецепторов и их транспорт по актиновым филаментам в дендритах [38]. Помимо AMPA-



**Рис. 1.** Характеристика анти-GRIP1-антител с использованием иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания. *а* – Схема строения молекулы GRIP1. *б* – Результат иммуноблоттинга гомогената фибробластов крысы REF52 с анти-GRIP1-антителами. *в* – Клетки REF52, обработанные одновременно анти-GRIP1 и анти-виментиновыми антителами. *г* – Такое же окрашивание клеток REF52, предварительно обработанных коллецидом до полной деполимеризации микротрубочек. Масштаб 10 мкм на всех изображениях.

рецепторов и ассоциированных с ними белков, GRIP1 участвует в доставке многих других карго, выполняя ряд важных функций в нейронах. В контексте этого исследования наиболее интересны такие партнеры GRIP1, как уже упоминавшиеся адаптерные (scaffolding) белки  $\alpha$ -липрины, известные партнеры тирозинфосфатаз семейства LAR, которые играют важную роль в организации синапсов [22, 39]. Однако обнаружено также, что  $\alpha$ -липрины локализуются в области ФК [40] и регулируют процесс их разборки [41].

Представленные в этой работе данные позволяют предположить, что GRIP1 может играть роль адаптера кинезина для ВФ и участвовать в их перемещении по микротрубочкам, по крайней мере, в эндотелиальных клетках. Предполагается, что GRIP1 нужен для доставки ВФ на периферию клетки и обеспечения тесного контакта виментина и ФК для их совместной стабилизации.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Плазмиды.** Клетки человека с нокаутом гена *GRIP1* получены по технологии CRISPR-Cas9 с использованием вектора pLentiV2, содержащего последовательность 5'-CTCCCGATAC-

CGTCAGACCC гидовой ПНК (вектор любезно предоставили Ameli Robert и Владимир Гельфанд, Northwestern University, Chicago, США). Для получения нокаута гена *GRIP1* в клетках мыши олигонуклеотиды 5'-CACCCAGTGTATGTTCCGAAGCTG и 5'-AAACCAGTTCGGAACATAA-CAGTCTG объединили в дуплекс, который фосфорилировали и лигировали в вектор pSpCas9(B-V)-2a-puro, разрезанный по сайту рестрикции Bbs1.

Вектор pCR-Blunt II-ТОПО-GRIP1, содержащий инвертированную последовательность кДНК изоформы 3 GRIP1 человека (NCBI gene ID 23426; accession number 021150.4), получен от компании "Open Biosystems" (США). Для получения полноразмерного GRIP1, слитого с Мусб-тагом на N-конце, последовательность, кодирующую GRIP1, перенесли из исходного вектора в вектор pCS2-MT по KpnI и XbaI-сайтам рестрикции. ДНК, кодирующая N-концевую область GRIP1, слитую с His6-тагом на N-конце, получена путем ПЦР на матрице pCS2-MT-GRIP1 со следующими праймерами: 5'-ATGGATCCATAGCTGTCTCTTTTAAATGC, содержит сайт рестрикции BamHI, и 5'-ATAAGCTTCTGGTCAAGTGGTGTGGCCAG, содержит HindIII-сайт, и лигирования в вектор pQE80L по этим сайтам. Вектор, кодирующий

тот же N-концевой участок GRIP1, но слитый на N-конце с GST, получен с помощью ПЦР на матрице pCS2-MT-GRIP1 с праймерами: 5'-ATCTCGAGATAGCTGTCTCTTTTAAATGC, включает сайт рестрикции XhoI, и 5'-CGCCACATCTGTCTGCAATAC. Продукт был лигирован в вектор pGEX4T-1, обработанный NotI, фрагментом Кленова и XhoI.

Вектор pcDNA3-hKHC, кодирующий тяжёлую цепь кинезина-1, любезно предоставил Richard Wubbolts (Utrecht University, Нидерланды). Конструкцию, кодирующую GFP-GBD, клонировали, используя вектор pcDNA3-hKHC в качестве матрицы для ПЦР со следующими праймерами: 5'-AAGGTACCGCTACAAGAGTTAAAAAG с KpnI-сайтом, и 5'-AAGGATCCAGTTGGAGAAGCTGCTGG с BamHI-сайтом. Продукт лигировали в вектор pEGFP-C1 по таким же сайтам рестрикции. Для получения GFP-GBDshort использовали такой же путь клонирования, но обратным праймером был 5'-AAGGATCCTTCTTTTCAGTGCTGATTC.

Все конструкции ДНК проверяли секвенированием.

Плазмида, кодирующая зиксин человека, слитый с mKate-FP, получена от компании "Евроген" (Москва, Россия).

**Антитела.** Антитела кролика к белку GRIP1 получены и очищены в нашей лаборатории. Для этого векторную ДНК, кодирующую N-концевую часть GRIP1 (аминокислотные остатки 1–330 изоформы 3), слитую с His6-тагом на N-конце (His6-GRIP1-N), ввели в *E. coli* штамм BL21(DE3). Бактерии растили в среде LB, собирали центрифугированием и лизировали с помощью ультразвука. Лизат осветляли центрифугированием, рекомбинантный белок очищали хроматографией на Ni-NTA-агарозе ("Quigen", США). Препарат белка был диализом переведен в PBS и использован для иммунизации двух кроликов. Для приготовления аффинной колонки тот же фрагмент GRIP1, слитый на N-конце с GST, синтезировали в клетках *E. coli* (штамм BL21(DE3)), очищали на глутатион-агарозе ("Sigma-Aldrich", США) и "привязывали" к BrCN-агарозе ("Sigma-Aldrich"). Для очистки антител фракцию иммуноглобулинов выделяли из сыворотки преципитацией в 50%-ном сульфате аммония, затем очищали антитела из этой фракции с помощью аффинной хроматографии.

В работе использовали следующие коммерческие антитела: антитела мыши к виментину V9 ("Sigma-Aldrich"); антитела мыши к винкулину hVin1 ("Novus Biologicals", США); антитела мыши к белку нейрофиламентов NF-L 200/160 ("Sigma-Aldrich"). Антитела

кролика к виментину мыши, обозначенные 3с8, получены предварительно в нашей лаборатории.

**Иммуноблотинг.** Для тестирования антител к GRIP1 клетки на чашках промывали 3 раза 0.25 М раствором сахарозы, лизировали в буфере Laemmli для образцов и прогревали при 98°C в течение 10 мин. Образцы подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), переносили на нитроцеллюлозные фильтры ("Amersham Biosciences", Великобритания) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре сначала с первичными, а затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Jackson ImmunoResearch Laboratories", Великобритания). Все инкубации проводили в буфере PBS с 0.05% Tween 20 и 0.05% неиммунной сыворотки крупного рогатого скота, после каждой инкубации фильтры промывали тем же буфером без сыворотки. Сигнал выявляли с помощью цветной реакции с диаминобензидином ("Sigma-Aldrich").

**Культивирование клеток и трансфекция.** Клетки млекопитающих REF52 и EA.hy926 инкубировали в среде DMEM ("Панэко", Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Sigma-Aldrich"), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки CAD поддерживали в таких же условиях, но в среде DMEM/F-12 ("Панэко"). Для индукции роста нейритов клетки CAD переносили в среду без сыворотки.

Для трансфекции клеток использовали реагент GenJector-U ("Молекта", Россия). Через 4 ч после введения ДНК клетки снимали с подложки, обрабатывая раствором трипсина, переносили на покровные стекла и инкубировали в стандартной среде в течение следующих 24–48 ч.

Для нокаута гена белка GRIP1 клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей Cas9 и гидовую РНК и содержащей ген устойчивости к пуромицину. Через 4 ч после введения ДНК клетки обрабатывали раствором трипсина и переносили в 10 см чашки Петри, через 2 дня среду в чашках заменяли свежей, содержащей пуромицин ("Sigma-Aldrich") в определенной концентрации – минимальной концентрации, вызывающей гибель 100% клеток исходной культуры: 1.2 мкг/мл – в случае клеток CAD и 0.6 мкг/мл – в случае EA.hy926. Выделяли клетки, выжившие и образовавшие колонии, методом иммуноблотинга определяли в них присутствие белка GRIP1.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Клетки на покровных стеклах фиксировали 3%-ным параформальдегидом в PBS (10 мин при

комнатной температуре) или метанолом при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 6 мин. Клетки инкубировали с антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере в буфере PBS с 1% BSA и 0.1% Тритоном X-100: сначала с первичными антителами, затем со вторичными, конъюгированными с флуорохромами FITC или TRITC ("Sigma-Aldrich"). По окончании инкубации стекла монтировали на предметные стекла и изучали под микроскопом Zeiss Axiovert M200 ("Carl Zeiss", ФРГ), оборудованным камерой Zeiss AxioCam MRm.

**Иммунопреципитация.** Опыт по иммунопреципитации проводили на клетках REF52. Клетки, выращенные на 12 чашках Петри диаметром 10 см, промывали 3 раза 0.25 М раствором сахарозы и лизировали на льду в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, 1% Тритона X-100, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ EGTA, pH 7.4, с добавлением ингибиторов протеаз ("Sigma-Aldrich"): 1 мл буфера на чашку. Лизат гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и осветляли центрифугированием при 40 000 g в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Экстракт был разделен на две части, которые параллельно инкубировали с 10 мкг антител против GRIP1, присоединенных к 4%-ной агарозе с белком A ("Sigma-Aldrich"). В качестве контроля использовали такую же порцию агарозы без добавления антител. Инкубацию проводили в течение 2 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . По окончании инкубации обе порции носителя промывали тем же буфером для лизиса клеток, суспендировали в 50 мкл буфера для образцов Laemmli, инкубировали при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин и подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

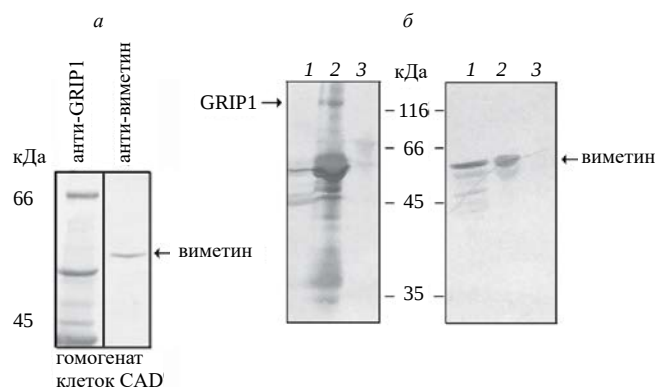
### *GRIP1 связывается с виментиновыми филаментами*

С целью изучения функций белка GRIP1 в клетках, отличных от нервных, были получены антитела к N-концевой области одной из изоформ белка GRIP1 человека, содержащей первые три PDZ-домена (рис. 1а). Как показало сравнение изоформ GRIP1 человека, мыши и крысы, эти три PDZ-домена являются наиболее консервативными, хотя предшествующие первому PDZ-домену N-концевые последовательности могут различаться. С другой стороны, анализ первичной структуры с помощью программы Protein BLAST (National Center for Biotechnology Information) не обнаружил, помимо GRIP1, каких-либо других белков со значительным уровнем гомологии с белком GRIP1. Поэтому результат тестирования полученных антител методом иммуноблоттинга

гомогенатов культивируемых клеток оказался неожиданным. Антитела к такому рекомбинантному белку из сывороток двух разных животных выявляли, помимо компонента с молекулярной массой около 130 кДа, соответствовавшего белку GRIP1, еще несколько иммунореактивных компонентов (рис. 1б), разных в гомогенатах разных клеточных линий (см. также другие рисунки). Такой результат нельзя объяснить присутствием в образцах нескольких изоформ GRIP1, поскольку в соответствии с базой данных NCBI предсказанные молекулярные массы вариантов GRIP1 варьируют в пределах 111–129 кДа. По-видимому, этот результат обусловлен протеолизом GRIP1, тем более что в нескольких работах показана регулируемая деградация GRIP1 [42, 43]. Иммунофлуоресцентное окрашивание культивируемых клеток млекопитающих выявило сложный паттерн: анти-GRIP1-антитела декорировали некие везикулярные структуры, а также филаменты. Определить везикулы, вводя в клетки плазмиды, кодирующие те или иные маркеры различных органелл, и анализируя их колокализацию со структурами, окрашенными антителами к GRIP1, не удалось. Филаменты же были идентифицированы как виментиновые, поскольку окрашивались антителами V9 к виментину (рис. 1в). На рис. 1 для примера приведены фибробласты REF52, содержащие густую сеть ВФ; однако сходный паттерн наблюдался и в клетках других линий (см. далее).

Чтобы различить ВФ и микротрубочки, паттерны распределения которых часто совпадают, клетки инкубировали с колцемидом до полной деполимеризации микротрубочек и последующей агрегации ВФ в окооядерной области. В таких клетках агрегировавшие ВФ по-прежнему декорировались анти-GRIP1-антителами, и картина в мелких деталях совпадала с картиной окрашивания антителами к виментину (рис. 1в).

Как показал иммуноблоттинг, сам виментин не связывал анти-GRIP1-антитела (рис. 2а), то есть их ассоциация с ВФ не была обусловлена прямым взаимодействием с виментином. Эта связь, по всей вероятности, обусловлена взаимодействием виментина с GRIP1, поскольку при использовании анти-GRIP1-антител для иммунопреципитации GRIP1 и связанных с ним белков из клеточного экстракта, виментин обнаруживался в иммунопреципитате (рис. 2б).



**Рис. 2.** Антитела к GRIP1 не взаимодействуют с виментином, но преципитируют его из клеточного экстракта. *a* — Два одинаковых иммуноблота с гомогенатом клеток CAD, параллельно обработанных антителами к GRIP1 и виментину. *б* — GRIP1 преципитирован из экстракта (1) клеток REF52; анти-GRIP1-преципитат (2) содержал виментин, в отличие от контрольного (3), полученного инкубацией такой же порции клеточного экстракта с чистыми агарозными гранулами с привязанным белком А.

*Ингибирование связывания GRIP1 и кинезина нарушает распределение виментиновых филаментов*

До сих пор функции GRIP1 изучали в основном на нейронах, поэтому имело смысл проверить, контролирует ли GRIP1 положение ВФ в линии клеток CAD мыши, которые сохранили в культуре многие свойства нейронов, в частности, способность выпускать длинные отростки [44]. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к виментину показало, что при дифференцировке, которая начиналась при переносе клеток в бессывороточную среду, ВФ сначала концентрировались в местах формирования будущих нейритов, а затем пучки филаментов заполняли длинные отростки, то есть подвергались транспорту в направлении, характерном для кинезина — к плюс-концам микротрубочек [1], которые обращены к концам отростков.

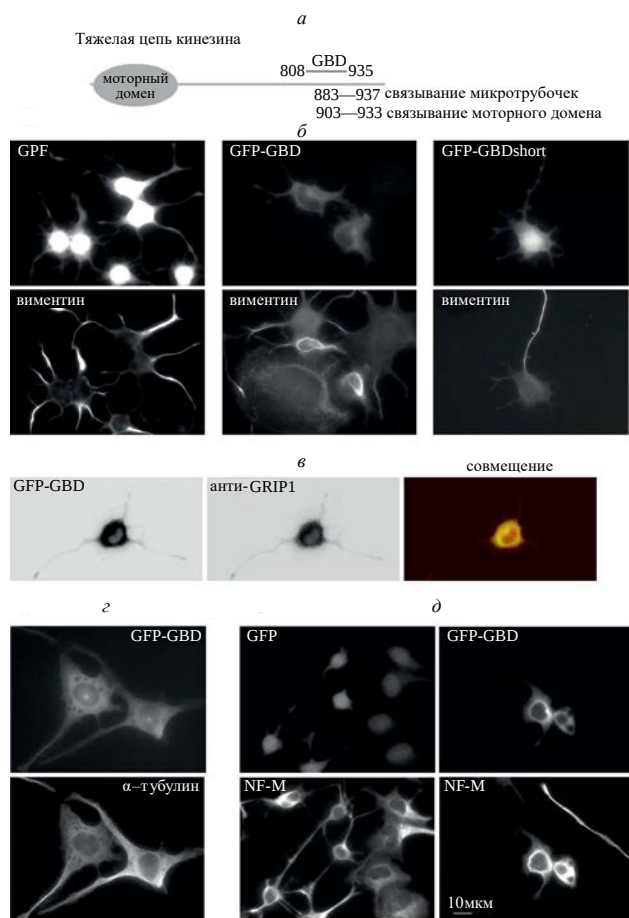
Важность взаимодействия белка GRIP1 и кинезина для продвижения ВФ по отросткам, проверяли прежде всего с использованием уже известного способа его доминантно-негативного ингибирования. В предыдущих исследованиях функций GRIP1 в нейронах в качестве такого ингибитора использовали GRIP1-Binding Domain (GBD), представлявший собой участок тяжелой цепи кинезина, ответственный за связывание GRIP1 (аминокислотные остатки 808–935 тяжелой цепи кинезина (KIF5B) человека) [17] (рис. 3а). Экспрессия плазмиды, кодирующей GFP-GBD (но не GFP, служащий контролем), индуцировала агрегацию ВФ внутри тела клетки

и предотвращала вход виментина в отростки (рис. 3б). Как видно на рис. 3б, эффект GFP-GBD проявлялся уже в довольно низкой (по сравнению с контрольными клетками) концентрации; высокая же концентрация GFP-GBD приводила к гибели клеток.

В клетках CAD, инкубированных в полной среде, анти-GRIP1-антитела также выявляли два типа структур: везикулы и филаменты, которые в этих клетках были очень бледными (рис. 4б). Окрашивание клеток CAD, синтезировавших GFP-GBD, антителами к GRIP1, выявило преимущественную локализацию обоих белков в теле клетки (для визуализации отростков на рис. 3в, представлены инвертированные изображения). Совмещение двух изображений позволяет предположить колокализацию белков, однако из-за того, что тела клеток CAD, сформировавших отростки, плохо распластываются на субстрате, различить детали было невозможно, за исключением везикул, которые окрашивались антителами к GRIP1, но очевидно не связывали GFP-GBD (рис. 3в). Вместе с тем, окрашивание клеток, содержащих GFP-GBD, антителами к  $\alpha$ -тубулину выявляло нормальное распределение микротрубочек (рис. 3г), поэтому эффект GFP-GBD можно было интерпретировать как затруднение в перемещении ВФ в направлении плюс-концов микротрубочек, то есть как нарушение работы кинезина.

Чтобы убедиться, что этот эффект специфичен в отношении ВФ, с которыми связан GRIP1, проверено влияние GFP-GBD на распределение в клетках CAD нейрофиламентов — еще одного типа филаментов, транспортируемых в нейронах кинезином [45]. Как можно видеть на рис. 3д, присутствие GFP-GBD аналогичным образом влияло и на вход в отростки нейрофиламентов. Следовательно, эффект этого доминантно-негативного ингибитора не был специфичным в отношении ВФ и GRIP1.

Причиной ингибирования транспорта промежуточных филаментов в отростки клеток CAD могло быть следующее обстоятельство: полипептид GBD содержит два важных для активности кинезина участка: первый (аминокислотные остатки 883–937) является сайтом связывания с микротрубочками [46], а второй (остатки 903–933) — это сайт автоингибирования [47] (рис. 3а). Поэтому нельзя было исключить, что эффект GFP-GBD обусловлен его связыванием с микротрубочками или моторным доменом кинезина, что должно препятствовать транспорту даже при нормальной системе микротрубочек. Чтобы проверить, критичен ли этот участок тяжелой цепи для GBD-индуцированного ингибирования кинезина, из плазмиды удалили последовательность, кодирующую аминокислотные остатки 883–935.

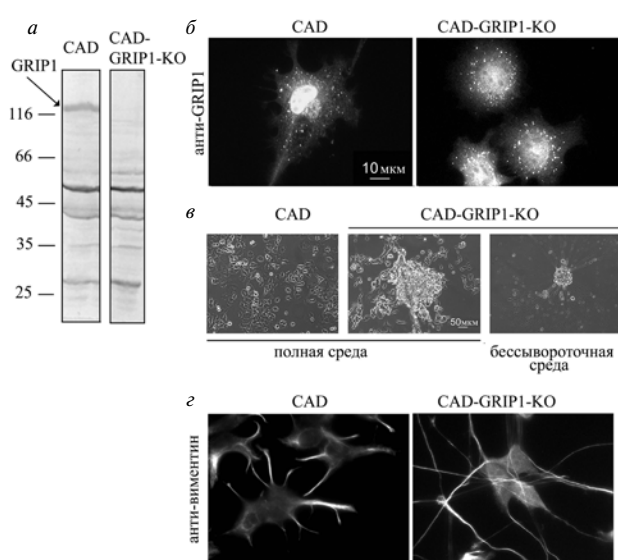


**Рис. 3.** Доминантно-негативное ингибирование взаимодействия GRIP1 с кинезином влияет на вход промежуточных филаментов (ВФ) в нейриты клеток CAD. *a* — Схема положения GBD (GRIP1 Binding Domain) на тяжелой цепи кинезина. *б* — Эффект присутствия GBD на распределение ВФ в клетках CAD. Клетки в полной среде трансфицированы плазмидой, кодирующей GFP-GBD, GFP (в качестве контроля) или GFP-GBD-short и через 20–24 ч перенесены в бессывороточную среду для индукции формирования отростков в течение последующих 48 ч. Затем клетки фиксировали и подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию: антителами 3с8 к виментину мыши (*б*), антителами к GRIP1 (*в*, изображения инвертированы для наглядности), антителами к  $\alpha$ -тубулину DM1 $\alpha$  (*г*) и антителами N2912 к белку NF-M нейрофиламентов (*д*). Масштабная линейка 10 мкм на всех изображениях.

Из рис. 3б видно, что белковый продукт GBD-short никак не влиял на распределение ВФ в клетках CAD.

#### *GRIP1 вовлечен в формирование фокальных контактов*

Поскольку доминантно-негативное ингибирование не дало однозначного результата, для истощения клеток CAD по белку GRIP1 применили метод CRISPR-Cas9. Как показал



**Рис. 4.** Нокаут гена белка GRIP1 меняет адгезивные свойства клеток CAD, но не препятствует заполнению отростков виментином. *a* — Иммуноблоттинг с анти-GRIP1-антителами гомогенатов клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1. *б* — Сравнение иммунофлуоресцентного окрашивания клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, анти-GRIP1-антителами. *в* — Фазово-контрастное изображение клеток CAD — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, в полной и бессывороточной среде. *г* — Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к виментину клеток CAD (контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1), инкубированных в бессывороточной среде. Части *б* и *г* — масштаб 10 мкм.

иммуноблоттинг с анти-GRIP1-антителами, в результате использования такого подхода из клеток CAD-GRIP1-KO исчез компонент с молекулярной массой около 130 кДа, который соответствовал белку GRIP1, но все остальные иммунореактивные компоненты сохранились (рис. 4а).

При окрашивании клеток CAD с нокаутом гена *GRIP1* анти-GRIP1-антителами везикулы были по-прежнему видны, однако декорирования ВФ уже не наблюдалось (рис. 4б). Этот результат позволил заключить, что ассоциация анти-GRIP1-антител с ВФ обусловлена присутствием полноразмерного белка GRIP1, а окрашивание везикул, по-видимому, определялось каким-то другим иммунореактивным компонентом, который пока не удалось идентифицировать.

Нокаут гена *GRIP1* не лишил клетки CAD-GRIP1-KO способности формировать отростки, причем не только в бессывороточной, но даже в полной среде. Однако оказалось, что произошло снижение адгезии клеток CAD к стеклу или пластику: в отсутствие сыворотки они образовывали большие,

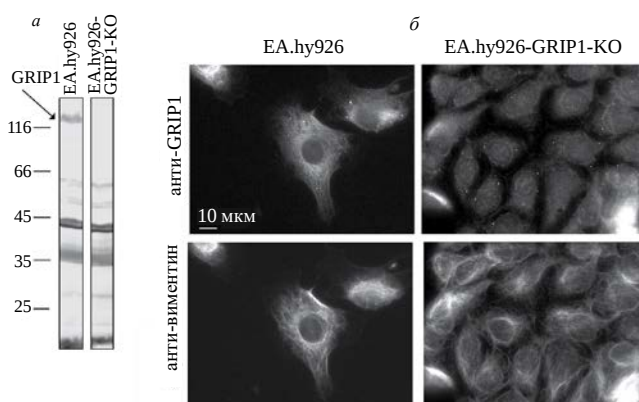
плавающие в среде агрегаты, окруженные множеством длинных тонких нейритов (рис. 4б). Иммунофлуоресцентное окрашивание редких прикрепившихся клеток показало, что отростки клеток с нокаутом содержали виментин и никаких признаков коллапса ВФ в телах клеток не наблюдалось (рис. 4г). Нельзя исключить, однако, что в клетках, потерявших способность к адгезии и объединившихся в плавающие агрегаты, ВФ претерпели коллапс. К сожалению, проверить это предположение оказалось технически невозможным. Таким образом, пока не ясно, нужен ли GRIP1 для формирования отростков и транспорта в них ВФ, но он явно важен для обеспечения адгезии.

Поскольку адгезия зависит от силы ФК, можно предположить, что в клетках, истощенных по белку GRIP1, нарушено функционирование ФК. Однако из-за снижения адгезии к стеклу иммунофлуоресцентное окрашивание ФК в клетках CAD с нокаутом оказалось технически невозможным. Поэтому тот же метод CRISPR-Cas9 был применен к другой линии клеток — эндотелиальным клеткам человека EA.hy926, которые часто служат моделью при исследовании фокальных и других клеточных контактов.

Иммуноблоттинг с анти-GRIP1-антителами показал, что из эндотелиальных клеток с нокаутом гена белка GRIP1 исчез также компонент с молекулярной массой 130 кДа, то есть полноразмерный GRIP1 (рис. 5а), при этом в клетках с нокаутом не наблюдалось декорирования виментиновых филаментов (рис. 5б).

Поведение эндотелиальных клеток EA.hy926 тоже заметно изменялось после нокаута гена *GRIP1*. Они начинали объединяться в “островки” (рис. 6б), а их адгезия к субстрату заметно снижалась, так что их было гораздо легче снять с пластика обработкой трипсином. Более того, иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру ФК винкулину показало отсутствие выраженных ФК в клетках с нокаутом (рис. 6в).

В клетках EA.hy926-GRIP1-KO, как и в клетках CAD с нокаутом, не было заметно классического коллапса ВФ, однако наблюдалось очевидное перераспределение виментина: появлялись плотные пучки филаментов, особенно в краевых клетках “островков” (рис. 6б). По-видимому, эти виментиновые пучки оставались связанными с интегринами [14], так как на поверхности, покрытой поли-*L*-лизинном, который препятствует связыванию интегринов с субстратом [48], пучки филаментов выглядели более рыхлыми (рис. 6б).

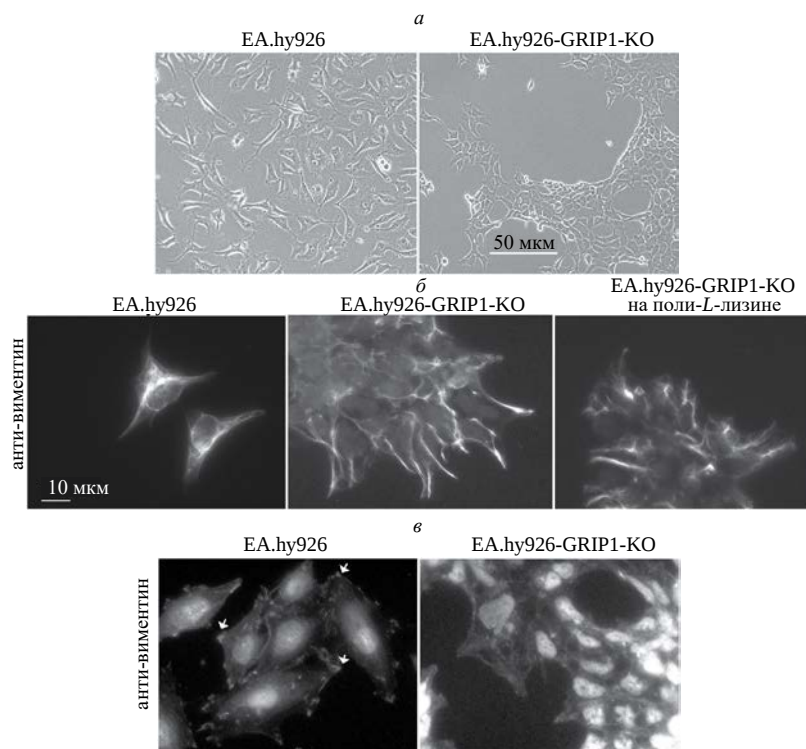


**Рис. 5.** Нокаут гена *GRIP1* в эндотелиальных клетках EA.hy926. *а* — Сравнение гомогенатов клеток EA.hy926 — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, в иммуноблоттинге с анти-GRIP1-антителами. *б* — Сравнение клеток EA.hy926 — контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1 — по двойному иммунофлуоресцентному окрашиванию анти-GRIP1-антителами и антителами к виментину.

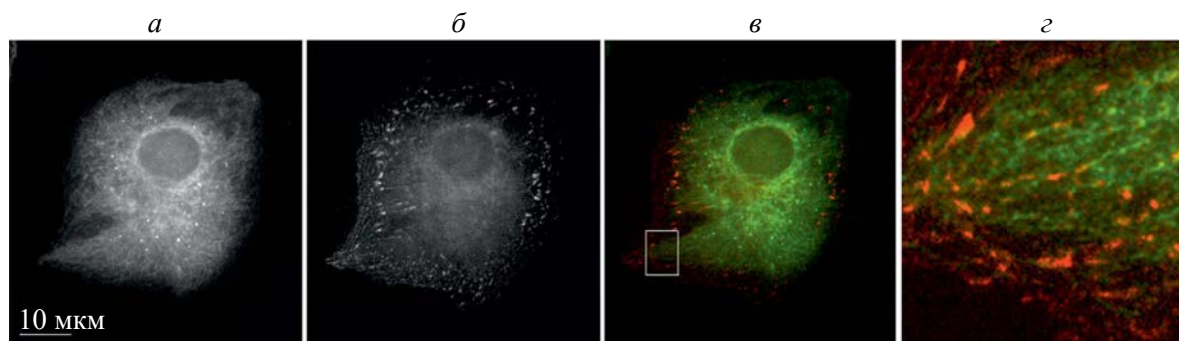
Попытка восстановить ФК в эндотелиальных клетках с нокаутом гена белка GRIP1 путем введения плазмиды, кодирующей изоформу 3 белка GRIP1 человека, не привела к успеху. По-видимому, с ФК связана некая другая изоформа белка.

Феномены разборки ФК в клетках эндотелия с нокаутом гена *GRIP1* и резкого изменения адгезивных свойств клеток требуют дальнейшего изучения. На данном этапе можно лишь предположить, что GRIP1 неким образом способствует стабилизации ФК, например, через доставку к ним ВФ, которые, как уже показано, оказывают на ФК стабилизирующее действие [9, 13]. Интересно, что микротрубочки и происходящий по ним транспорт в таком случае играют двоякую роль, поскольку они необходимы и для противоположного процесса естественной разборки ФК и обмена их компонентов [49]. Так, деполимеризация микротрубочек вызывает рост ФК [48], который можно объяснить сдвигом равновесия в сторону их сборки и стабилизации, тем более что ВФ еще некоторое время остаются связанными с ФК [7]. На рис. 7 представлен результат одновременной визуализации ФК и филаментов, декорированных анти-GRIP1-антителами, выявляющий их колокализацию на периферии фибробласта.

Взаимодействие GRIP1 с кинезином и ключевая роль кинезина в транспорте ВФ в направлении плюс-концов микротрубочек давно установлены [6, 18]. Если GRIP1 это действительно адаптер, соединяющий кинезин с ВФ для их транспорта, то ингибирование их взаимодействия должно вызывать агрегацию ВФ, как это происходит при микроинъекции ингибирующих антител против кинезина [3]



**Рис. 6.** В истощенных по белку GRIP1 эндотелиальных клетках EA.hy926 отсутствуют ФК и меняется расположение ВФ. *а* – Фазово-контрастное изображение клеток EA.hy926 – контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1. *б* – Распределение виментина (антитела V9) в клетках EA.hy926 – контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1, на простом стекле и стекле, покрытом поли-*L*-лизинном. *в* – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток EA.hy926 (контрольных и с нокаутом гена белка GRIP1) антителами к винкулину, маркеру ФК. Стрелками указаны ФК. Части *б* и *в* масштаб 10 мкм, *а* – 50 мкм.



**Рис. 7.** GRIP1 и фокальные контакты (ФК) колокализуются на периферии фибробласта. Взаимное расположение филаментов, декорированных анти-GRIP1-антителами (*а*), и ФК (*б*) в фибробласте REF52. ФК визуализированы по экспрессии плазмиды, кодирующей зиксин человека, слитый с флуоресцирующим белком mKate. Последнее изображение (*г*) является увеличенным участком, выделенным на совмещенном изображении (*в*).

или при деполимеризации микротрубочек [2]. Причиной того, что в клетках CAD и EA.hy926, лишенных GRIP1, ВФ не агрегировали в окооядерной области, вероятно, может быть присутствие другого, отличного от GRIP1, адаптерного белка, который отвечает за поддержание распределения ВФ по всей цитоплазме и в отростках нейронов. В нейронах, моделью которых служат клетки CAD, ФК важны главным образом для направленного роста аксона, который происходит благодаря тому, что

конус роста обладает механочувствительностью [50]. Вносит ли GRIP1 вклад в этот процесс, пока непонятно. Насколько прочно связывались концы отростков с субстратом и сохранились ли ФК в конусах роста при истощении клеток CAD по белку GRIP1, осталось неясным из-за технических трудностей. Что касается клеток эндотелия, то участие GRIP1 в качестве специального адаптера в поддержании связи ФК с ВФ может объясняться тем, что эндотелиальные клетки нуждаются в надежном контакте с субстратом

для успешной пролиферации, а потеря связи с внеклеточным матриксом вызывает в них апоптоз [51].

Таким образом, в данной работе обнаружена, с одной стороны, ассоциация уже известного белка-адаптера кинезина GRIP1 с уже известным видом карго, транспортируемого кинезином — ВФ, с другой стороны, выявлена роль GRIP1 в поддержании адгезивных свойств у по крайней мере двух типов клеток и организации ФК в клетках эндотелия. Поскольку роль ВФ в стабилизации ФК убедительно показана, можно предположить, что для выполнения этой функции ВФ должны располагаться в непосредственной близости к ФК, то есть должны доставляться на периферию клетки посредством активного транспорта с помощью кинезина, и связь кинезина с ВФ осуществляет адаптерный белок GRIP1. Можно предположить также, что белок GRIP1 играет роль посредника, взаимодействующего с ВФ и неким компонентом ФК.

Выражаю глубокую благодарность моим коллегам: Владимиру Родионову (University of Connecticut Health Center, Farmington, США) — за помощь в приобретении плазмиды, кодирующей GRIP1, Ольге Плетюшкиной (МГУ, Москва, Россия) — за культуру клеток EA.hy926, Ameli Robert и Владимиру Гельфанду (Northwestern University, Chicago, США) — за культуру клеток CAD и CRISPR vector, а также за ценные критические замечания, Александру Минину (Институт белка РАН, Пушкино, Россия) — за активное обсуждение работы, Наталии Мининой (Институт белка РАН, Пушкино, Россия) — за техническую помощь и советы.

Эта работа поддержана Российским научным фондом (проект 23-74-00036).

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

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hookway C., Ding L., Davidson M.W., Rappoport J.Z., Danuser G., Gelfand V.I. (2015) Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Mol. Biol. Cell.* **26**, 1675–1686.
- Forry-Schaudies S., Murray J.M., Toyama Y., Holtzer H. (1986) Effects of colcemid and taxol on microtubules and intermediate filaments in chick embryo fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **6**, 324–338.
- Gyoeva F.K., Gelfand V.I. (1991) Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature.* **353**, 445–448.
- Robert A., Tian P., Adam S.A., Kittisopikul M., Jaqaman K., Goldman R.D., Gelfand V.I. (2019) Kinesin-dependent transport of keratin filaments: a unified mechanism for intermediate filament transport. *FASEB J.* **33**, 388–399.
- Hollenbeck P.J., Bershadsky A.D., Pletjushkina O.Y., Tint I.S., Vasiliev J.M. (1989) Intermediate filament collapse is an ATP-dependent and actin-dependent process. *J. Cell Sci.* **92**, 621–631.
- Fu M.M., Holzbaur E.L.F. (2014) Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* **24**, 564–574.
- Bershadsky A.B., Tint I.S., Svitkina T.M. (1987) Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **8**, 274–283.
- Ivaska J., Pallari H.M., Nevo J., Eriksson J.E. (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* **313**, 2050–2062.
- Tsuruta D., Jones J.C.R. (2003) The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J. Cell Sci.* **116**, 4977–4984.
- Cattaruzza M., Lattrich C., Hecker M. (2004) Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* **43**, 1–5.
- Burridge K., Guilluy C. (2016) Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp. Cell Res.* **343**, 14–20.
- Seetharaman S., Etienne-Manneville S. (2019) Microtubules at focal adhesions — a double-edged sword. *J. Cell Sci.* **132**, 1–11.
- Gonzales M., Weksler B., Tsuruta D., Goldman R.D., Yoon K.J., Hopkinson S.B., Flitney F.W., Jones J.C.R. (2001) Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 85–100.
- Bhattacharya R., Gonzalez A.M., DeBiase P.J., Trejo H.E., Goldman R.D., Flitney F.W., Jones J.C.R. (2009) Recruitment of vimentin to the cell surface by  $\beta 3$  integrin and plectin mediates adhesion strength. *J. Cell Sci.* **122**, 1390–1400.
- Vohnoutka R.B., Gulvady A.C., Goreczny G., Alpha K., Handelman S.K., Sexton J.Z., Turner C.E. (2019) The focal adhesion scaffold protein Hic-5 regulates vimentin organization in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 3037–3056.
- Burgstaller G., Gregor M., Winter L., Wiche G. (2010) Keeping the vimentin network under control: cell-matrix adhesion-associated plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 3362–3375.
- Setou M., Seog D.-H., Tanaka Y., Kanai Y., Takei Y., Kawagishi M., Hirokawa N. (2002) Glutamate-re-

- ceptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*. **417**, 83–87.
18. Li B., Trueb B. (2001) Analysis of the  $\alpha$ -actinin/zyxin interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 33328–33335.
  19. Coutts A.S., MacKenzie E., Griffith E., Black D.M. (2003) TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J. Cell Sci.* **116**, 897–906.
  20. Lv K., Chen L., Li Y., Li Z., Zheng P., Liu Y., Chen J., Teng J. (2015) Trip6 promotes dendritic morphogenesis through dephosphorylated GRIP1-dependent myosin VI and F-actin organization. *J. Neurosci.* **35**, 2559–2571.
  21. Wyszynski M., Kim E., Dunah A.W., Passafaro M., Valtchanoff J.G., Serra-Pages C., Streuli M., Weinberg R.J., Sheng M. (2002) Interaction between GRIP and liprin- $\alpha$ /SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron*. **34**, 39–52.
  22. Takamiya K., Kostourou V., Adams S., Jadeja S., Chalepakis G., Scambler P.J., Haganir R.L., Adams R.H. (2004) A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1. *Nat. Genet.* **36**, 172–177.
  23. Modjeski K.L., Ture S.K., Field D.J., Cameron S.J., Morrell C.N. (2016) Glutamate receptor interacting protein 1 mediates platelet adhesion and thrombus formation. *PLoS One*. **11**, e0160638.
  24. Geiger J.C., Lipka J., Segura I., Hoyer S., Schlager M.A., Wulf P.S., Weinges S., Demmers J., Hoogenraad C.C., Acker-Palmer A. (2014) The GRIP1/14-3-3 pathway coordinates cargo trafficking and dendrite development. *Dev. Cell*. **28**, 381–393.
  25. Charych E.I., Li R., Serwanski D.R., Li X., Miralles C.P., Pinal N., Blas A.L.D. (2006) Identification and characterization of two novel splice forms of GRIP1 in the rat brain. *J. Neurochem.* **97**, 884–898.
  26. Yamazaki M., Fukay M., Abe M., Ikeno K., Kakizaki T., Watanabe M., Sakimura K. (2001) Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci. Lett.* **304**, 81–84.
  27. Hanley L.J., Henley J.M. (2010) Differential roles of GRIP1a and GRIP1b in AMPA receptor trafficking. *Neurosci. Lett.* **485**, 167–172.
  28. DeSouza S., Fu J., States B.A., Ziff E.B. (2002) Differential palmitoylation directs the AMPA receptor-binding protein ABP to spines or to intracellular clusters. *J. Neurosci.* **22**, 3493–3503.
  29. Dong H., O'Brien R.J., Fung E.T., Lanahan A.A., Worley P.F., Haganir R.L. (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. **386**, 279–284.
  30. Pfennig S., Foss F., Bissen D., Harde E., Treeck J.C., Segarra M., Acker-Palmer A. (2017) GRIP1 binds to ApoER2 and ephrinB2 to induce activity-dependent AMPA receptor insertion at the synapse. *Cell Rep.* **21**, 84–96.
  31. Steiner P., Alberi S., Kulangara K., Yersin A., Sarria J.C.F., Regulier E., Kasas S., Dietler G., Muller D., Catsicas S., Hirling H. (2005) Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. *EMBO J.* **24**, 2873–2884.
  32. Zhang J., Wang Y., Chi Z., Keuss M.J., Pai Y.-M.P., Kang H.C., Shin J., Bugayenko A., Wang H., Xiong Y., Pletnikov M.V., Mattson M.P., Dawson T.M., Dawson V.L. (2011) The AAA+ ATPase, Thorase regulates AMPA receptor-dependent synaptic plasticity and behavior. *Cell*. **145**, 284–299.
  33. Ye B., Sugo N., Hurn P.D., Haganir R.L. (2002) Physiological and pathological caspase cleavage of the neuronal RASGEF GRASP-1 as detected using a cleavage site-specific antibody. *Neuroscience*. **114**, 217–227.
  34. Davidkova G., Carroll R.C. (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 13273–13278.
  35. Mao L., Takamiya K., Thomas G., Lin D.T., Haganir R.L. (2010) GRIP1 and 2 regulate activity-dependent AMPA receptor recycling via exocyst complex interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 19038–19043.
  36. Stegmüller J., Werner H., Nave K.A., Trotter J. (2003) The proteoglycan NG2 is complexed with  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ Glutamate Receptor Interaction Protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 3590–3598.
  37. Heisler F.F., Lee H.K., Gromova K.V., Pechmann Y., Schurek B., Ruschkies L., Schroeder M., Schweizer M., Kneussel M. (2014) GRIP1 interlinks N-cadherin and AMPA receptors at vesicles to promote combined cargo transport into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 135030–135035.
  38. Wagner W., Lippmann K., Heisler F.F., Gromova K.V., Lombino F.L., Roesler M.K., Pechmann Y., Hornig S., Schweizer M., Polo S., Schwarz J.R., Eilers J., Kneussel M. (2019) Myosin VI drives clathrin-mediated AMPA receptor endocytosis to facilitate cerebellar long-term depression. *Cell Rep.* **28**, 11–20.
  39. Xie X., Liang M., Yu C., Wei Z. (2021) Liprin- $\alpha$ -mediated assemblies and their roles in synapse formation. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 653381.
  40. Astro V., Tonoli D., Chiaretti S., Badanai S., Sala K., Zerial M., de Curtis I. (2016) Liprin- $\alpha$ 1 and ERC1 control cell edge dynamics by promoting focal adhesion turnover. *Sci. Rep.* **6**, 33653.
  41. Pehkonen H., de Curtis I., Monni O. (2021) Liprins in oncogenic signaling and cancer cell adhesion. *Oncogene*. **40**, 6406–6416.
  42. Lu X., Wyszynski M., Sheng M., Baudry M. (2007) Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. *J. Neurochem.* **77**, 1553–1560.
  43. Guo L., Wang Y. (2007) Glutamate stimulates glutamate receptor interacting protein 1 degradation by

- ubiquitin-proteasome system to regulate surface expression of GluR2. *Neuroscience*. **145**, 100–109.
44. Qi Y., Wang J.K.T., McMillian M., Chikaraishi D.M. (1997) Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J. Neurosci.* **17**, 1217–1225.
  45. Shea T.B., Flanagan L.A. (2001) Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci.* **24**, 644–648.
  46. Hackney D.D., Stock M.F. (2000) Kinesin's IAK tail domain inhibits initial microtubule-stimulated ADP release. *Nat. Cell Biol.* **2**, 257–260.
  47. Yonekura H., Nomura A., Ozawa H., Tatsu Y., Yumoto N., Uyeda T.Q.P. (2006) Mechanism of tail-mediated inhibition of kinesin activities studied using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 420–427.
  48. Bershadsky A., Chausovsky A., Becker E., Lyubimova A., Geiger B. (1996) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6**, 1279–1289.
  49. Kaverina I., Krylyshkina O., Small J.V. (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033–1044.
  50. Wang D-Y., Melero C., Albaraky A., Atherton P., Jansen K.A., Dimitracopoulos A., Dajas-Bailador F., Reid A., Franze K., Ballestrem C. (2021) Vinculin is required for neuronal mechanosensing but not for axon outgrowth. *Exp. Cell Res.* **407**, 112805–112811.
  51. Meredith J.E., Fazeli B., Schwartz M.A. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 953–961.

## GRIP1 is Involved in the Interaction of Vimentin Filaments with Focal Adhesions in Endothelial Cells

F. K. Gyoeva<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pouschino, Moscow Region, 142290 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: fggyoeva@gmail.com*

Vimentin intermediate filaments are dynamic structures that are able to move in cytoplasm due to activity of the motor proteins, kinesin-1 and cytoplasmic dynein. How exactly motors interact with vimentin filaments remains unclear. In this work, I show that Glutamate Receptor Interacting Protein (GRIP1) known as adapter for kinesin-1 on neuronal cargoes is also a mediator for kinesin-1 interaction with vimentin filaments, and this interaction provides crosstalk between vimentin filaments and focal adhesions. GRIP1 associates with vimentin filaments in various cells and co-immunoprecipitates with vimentin from cell lysate. Human endothelial cells knockout by *GRIP1* gene lose focal adhesions and dramatically change their adhesive properties. Hypothetically, kinesin-1 engages GRIP1 to deliver vimentin filaments to the cell periphery so that they make contact with focal adhesions and stabilize them.

**Keywords:** Glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1), kinesin, vimentin intermediate filaments, focal adhesions

УДК 579.017.7

## ИНАКТИВАЦИЯ ФИМБРИЙ ТИПА 3 УСИЛИВАЕТ АДГЕЗИЮ *Klebsiella oxytoca* К КЛЕТКАМ ЭПИТЕЛИЯ ЛЕГКИХ

© 2024 г. А. Г. Гилязева<sup>а, \*</sup>, А. М. Марданова<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,  
Казань, 420008 Россия

\*e-mail: adeliyagilyazeva@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 29.03.2024 г.

Бактерии *Klebsiella oxytoca* являются возбудителями различных внебольничных и внутрибольничных инфекций, в том числе инфекций мочевыводящих путей, внутрибольничной пневмонии, антибиотик-ассоциированной диареи, однако факторы вирулентности данного вида изучены недостаточно. С помощью разных субстратов нами охарактеризован адгезивный потенциал урологического изолята *K. oxytoca* НК-1. Показано, что этот штамм эффективно адгезирует к эпителиальным клеточным линиям, гликозилированным и негликозилированным белкам и полистиролу, а также вызывает агрегацию клеток дрожжей, что указывает на наличие фимбрий типа 1 и 3 — органелл, обеспечивающих адгезию энтеробактерий к широкому кругу субстратов. В геноме *K. oxytoca* НК-1 обнаружены опероны фимбрий типа 1 и типа 3; оперон фимбрий типа 3 представлен двумя копиями. Сконструированы мутанты с инактивированными генами этих фимбрий. Показано, что инаktivация генов фимбрий типа 1 не влияет на адгезию бактерий, в то время как инаktivация генов фимбрий типа 3 повышает адгезию *K. oxytoca* НК-1 к клеткам эпителия легких (линия H1299); дополнительным индуктором повышенной адгезивности является манноза. При этом адгезия данного мутанта к другим субстратам не меняется. Полученные данные указывают на многофакторность аппарата адгезии *K. oxytoca* и возможность компенсаторной экспрессии или сверхэкспрессии генов других адгезинов в отсутствие фимбрий типа 1 и / или 3.

**Ключевые слова:** *Klebsiella oxytoca*, адгезия, фимбрии типа 1 и 3, адгезин, нокаут генов и оперонов, манноза, компенсаторная экспрессия, гиперадгезивный фенотип

DOI: 10.31857/S0026898424050084, EDN: HUMBXW

### ВВЕДЕНИЕ

Порядок Enterobacterales включает множество абсолютно и условно патогенных бактерий. Факторы вирулентности абсолютных патогенов, таких как *Yersinia spp.*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.* и др., изучены достаточно подробно, тогда как гораздо меньше известно о факторах вирулентности условных патогенов, таких как *Klebsiella oxytoca*. *K. oxytoca* представлена

комплексом видов: *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. pasteurii*, *K. grimontii*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis* и тремя новыми неназванными видами, дифференцируемыми по нуклеотидной последовательности гена *bla<sub>OXA</sub>*, кодирующего β-лактамазу [1]. Фенотипически виды этого комплекса неотличимы друг от друга, поэтому в рутинной практике все бактериальные изоляты, как правило, определяют как вид *K. oxytoca*.

*K. oxytoca* — второй по клинической значимости вид внутри этого рода после *K. pneumoniae* [2]. Установлено, что пенициллинотерапия приводит к дисбиозу кишечной микробиоты и чрезмерному росту бактерий *K. oxytoca* [3], что, в свою очередь, может привести к развитию воспалительного заболевания кишечника — антибиотик-ассоциированного геморрагического колита [3], а также к развитию позднего неона-

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин; ИМП — инфекция мочевыводящих путей; КАИМП — катетер-ассоциированная инфекция мочевыводящих путей; КОЕ — колониеобразующая единица; ЛБ — лизогенный бульон; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; FRT-сайт — сайт узнавания Flp-рекомбиназой; SOC — супероптимальный бульон с подавлением катаболитов.

тального сепсиса, менингита или некротизирующего энтероколита у недоношенных младенцев [4]. *K. oxytoca* является также возбудителем инфекций мочевыводящих путей (ИМП), в том числе катетер-ассоциированных (КАИМП), мягких тканей, ран, внутрибрюшных инфекций, бактериемии и внутрибольничной пневмонии [3, 5–8]. В частности, доля *K. oxytoca* в спектре уропатогенных возбудителей варьирует между 1 и 3.5%, однако среди беременных женщин это значение достигает 19–38% [9].

Недавно было показано, что у пациентов с COVID-19 микробиота легких насыщается *K. oxytoca* [10]. Кроме того, у находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) пациентов, в том числе с COVID-19, часто развивается нозокомиальная пневмония, имеющая бактериальную природу [11]. По данным Национальной сети безопасности здравоохранения США за 2006–2007 гг. развитие ИВЛ-ассоциированной пневмонии в 2.2% случаев вызвано *K. oxytoca* [12]. Тем не менее, этиология ИВЛ-ассоциированной пневмонии зависит от многих факторов, включая демографические особенности, географическое положение и др. [11].

Изучение факторов вирулентности патогенов важно не только с фундаментальной точки зрения, но и с практической: за последние десятилетия возрос интерес к разработке и применению новых лекарственных средств, действующих на факторы вирулентности возбудителей — вакцин и патоблокаторов [13, 14]. Вакцинация направляет иммунные реакции организма на ключевые этапы патогенеза, а патоблокаторы инактивируют структуры, обеспечивающие вирулентность бактерий, тем самым подавляя их способность вызывать заболевание [13, 14]. Таким образом, действие препаратов обоих типов направлено на факторы вирулентности патогенов, а главная роль в защите от них отводится собственным механизмам иммунитета хозяина.

Адгезия бактерий к поверхности является начальным и ключевым этапом развития инфекции [15]. Патогенные бактерии адгезируют к эпителию или имплантируемому медицинским изделиям (катетерам, трахеальным трубкам и др.) с помощью разнообразных поверхностных афимбриальных и фимбриальных белковых адгезинов. Афимбриальные адгезины расположены на поверхности клетки в виде отдельных молекул или многокомпонентных агрегатов. Однако более эффективную адгезию обеспечивают адгезины, расположенные на фимбриях — нитевидных полимерных структурах, присущих большинству грамотрицательных и ряду грамположительных бактерий [16, 17]. Важную роль в патогенезе инфекций играют шаперон-ашерные фимбрии, экспорт и сборка

которых происходит с помощью собственного молекулярного аппарата, а не общей системы секреции [18]. Периплазматический шаперон формирует комплекс с каждой структурной субъединицей фимбрии, обеспечивая фолдинг и препятствуя преждевременной полимеризации, и переносит ее к белку-ашеру в наружной мембране, который производит сборку фимбрий на поверхности клетки.

К шаперон-ашерным фимбриям относятся фимбрии типа 1 и 3, характерные для вида *K. pneumoniae*, близкородственного *K. oxytoca*. Они обеспечивают адгезию бактерий к клеткам эпителия кишечника, мочевого пузыря и других органов, а также к поверхности медицинских изделий, что необходимо для формирования биопленок [18]. Фимбрии типа 1 и 3 хорошо охарактеризованы у *K. pneumoniae*, тогда как у *K. oxytoca* их функциональное значение подробно не изучено, а имеющиеся данные сводятся лишь к результатам скрининговых описательных исследований. Так, в ряде работ отмечена взаимосвязь продукции фимбрий типа 1 и 3 и способности клинических штаммов *K. oxytoca* к формированию биопленок [19, 20]. Продукция этих фимбрий описана также у штаммов *K. oxytoca*, способных к адгезии на эпителиальные клетки [21, 22]. В связи с этим, цель данной работы заключалась в том, чтобы охарактеризовать адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1 и оценить вклад фимбрий типа 1 и 3.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования и условия культивирования.** Штамм *K. oxytoca* NK-1 выделен с поверхности мочеточникового стента пациентки с КАИМП. Бактерии культивировали при 37°C в лизогенном бульоне (ЛБ) [23], при необходимости добавляли антибиотики: гентамицин (7 мкг/мл), хлорамфеникол (20 мкг/мл) или канамицин (50 мкг/мл). Агаризированная среда содержала 2% агара. Бактерии для оценки их адгезивных свойств выращивали в условиях, оптимальных для продукции фимбрий (без аэрации в течение 48 ч при 37°C); для подавления продукции фимбрий бактерии выращивали в тех же условиях, но при 30°C [24]. Для восстановления жизнеспособности бактерий после трансформации использовали супероптимальный бульон с подавлением катаболитов (SOC) [23]; для получения ночной культуры бактерии культивировали с аэрацией в течение 16 ч.

**Плазмиды и клеточные линии,** использованные в работе, любезно предоставлены доктором Rafał Kolenda, сотрудником лаборатории много-

параметрического анализа Бранденбургского технического университета Cottbus-Senftenberg (Германия). Плазмиды pKD4, pKD46-Gm и pCP20 [25, 26] использовали на разных этапах инактивации генов и оперонов. Линии клеток эпителия мочевого пузыря (5637), кишечника (Caco-2) и легких человека (H1299) использовали для определения адгезивности бактерий. Клеточные линии выращивали в коммерческих средах (“Merck”, Германия; 5637 в RPMI-1640, остальные линии в DMEM/F12), содержащих дополнительно 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 mM *L*-глутамин, 1 mM пируват натрия, 1% заменимых аминокислот (только для H1299) и антибиотики — пенициллин и стрептомицин (по 100 ЕД /мл). Клеточные линии культивировали при 37°C, повышенной влажности и 5% CO<sub>2</sub>.

**Характеристика адгезивных свойств бактерий.** Фимбрии на поверхности штамма *K. oxytoca* NK-1 выявляли методом дрожжевой агглютинации [27]. Бактерии (ОП<sub>600</sub> = 1) и 2%-ные пекарские дрожжи, ресуспендированные в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), смешивали на предметном стекле в равном соотношении (по 15 мкл); для определения типа фимбрий к смеси добавляли 15 мкл 0.2 М маннозы. Степень агглютинации определяли визуально и оценивали по скорости образования хлопьев как слабую (+ — время образования более 20 с), умеренную (++) — время образования 5–20 с), высокую (+++) — до 5 с).

Адгезию исследовали на плоскостонных полистирольных планшетах Nunc (“Thermo Fisher Scientific”, США) разного формата. В качестве субстратов для адгезии использовали клеточные линии и адсорбированные белки — гликозилированные (РНКаза В) и негликозилированные (бычий сывороточный альбумин, БСА). Клеточные линии выращивали в 24-луночных планшетах с поверхностью Nunclon Delta (“Thermo Fisher Scientific”) до достижения 80–90% монослоя, промывали 2 раза в ФСБ и добавляли в лунки свежую среду без антибиотиков. В лунки 96-луночного планшета MaxiSorp добавляли РНКазу В (“Sigma-Aldrich”, США) или БСА (“Roth”, Германия) — 50 мкл в концентрации 5 мг/мл в 0.1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.6. После инкубации в течение 12 ч при 4°C лунки промывали 1%-ным БСА и высушивали на воздухе.

Бактериальную культуру центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин. Клетки промывали 3 раза в ФСБ и ресуспендировали в среде для культивирования клеточных линий без антибиотиков (для анализа адгезии к эукариотическим клеткам) или 1% БСА (для анализа адгезии к адсорбированным белкам). Лунки инфицировали бактериальной суспензией —

20 × 10<sup>6</sup> бактерий (клеточные линии) или 5 × 10<sup>6</sup> бактерий (белки). После 2 ч инкубации лунки 3 раза промывали ФСБ для удаления несвязавшихся бактерий. Клетки эукариот с адгезированными бактериями разрушали, добавляя в лунку 200 мкл 0.1%-го Тритона X-100 на 5 мин. Готовили серию десятикратных разведений, которые высевали на агаризованную среду ЛБ для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Результаты выражали как количество КОЕ на 1 мм<sup>2</sup> поверхности монослоя (площадь поверхности лунки 1.9 см<sup>2</sup>). Бактерии, связанные с белками, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, промывали в ФСБ, окрашивали иодидом пропидия и сканировали с помощью автоматизированной системы флуоресцентной микроскопии Aklides (“Medipan”, Германия); подсчет бактерий в 1 мм<sup>2</sup> проводили в программе Maxislider v.4.02. О влиянии инактивации на адгезивность мутанта судили по эффективности адгезии, выраженной как отношение уровня адгезии мутанта к уровню адгезии штамма дикого типа, принятого за 100%.

Для визуализации адгезированных бактерий клеточную линию 5637 выращивали на стерильных покровных стеклах в 24-луночном планшете. Инфицированные и промытые клетки фиксировали 1%-ным глутаровым альдегидом (“Sigma-Aldrich”) в течение 12 ч, промывали 2 раза в ФСБ и обезвоживали растворами этанола в восходящей концентрации (от 30 до 96%) по 2 раза в течение 30 мин. Анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Merlin (“Carl Zeiss”, Германия) [28].

**Поиск генов фимбрий** в геноме штамма NK-1, секвенированном нами ранее [29], проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Сравнительный анализ геномных локусов проводили с помощью программы Easyfig v. 2.2.3. Белковые мотивы в аминокислотных последовательностях предсказывали с помощью программы ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

**Инактивацию генов и оперонов** проводили с помощью системы рекомбинации фага λ Red по методу, описанному ранее [25], с модификациями для энтеробактерий [30]. Удаляли как гены адгезинов, так и полные опероны, чтобы исключить вклад других структурных субъединиц в адгезию.

На всех этапах генетический материал доставляли в клетки бактерий с помощью электропорации: 50 мкл электрокомпетентных клеток и 1 мкл плазмиды (40–50 нг) или 5 мкл ПЦР-продукта (1000 нг) помещали в холодную кювету с зазором 4 мм. Процедуру проводили с помощью прибора MicroPulser (“Bio-Rad”,

США) при следующих параметрах: напряжение 2.5 кВ, емкость 25 мкФ, сопротивление 200 Ом. Сразу после воздействия электрического импульса к клеткам добавляли 900 мкл среды SOC.

Для получения электрокомпетентных клеток нативного штамма ночную культуру инокулировали в свежую среду в соотношении 1 : 100 и выращивали с аэрацией до  $ОП_{600} = 0.5–0.6$ . Далее клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, осаждали (12 мин при 4500 g), 2 раза промывали холодной дистиллированной водой и концентрировали в ней же в 100 раз относительно первоначального объема культуры. Далее клетки трансформировали плазмидой pKD46-Gm, кодирующей рекомбиназу фага  $\lambda$  Red, и культивировали при 30°C с аэрацией в течение 1 ч.

Трансформанты культивировали на плотной среде ЛБ с гентамицином при 30°C и использовали для получения вторичных электрокомпетентных клеток. После достижения  $ОП_{600} = 0.2–0.3$  к культуре добавляли 0.2% арабинозы для индукции экспрессии гена рекомбиназы фага  $\lambda$  Red. После дальнейшего культивирования в течение 30–45 мин культуру инкубировали в течение 15 мин в водяной бане при 42°C и далее 15 мин во льду. После осаждения и промывания клетки трансформировали ПЦР-амплификатом гена устойчивости к канамицину kan, фланкированного прямыми повторами (FRT-сайтами). Благодаря использованию составных праймеров для инактивации (табл. 1),

ген был фланкирован также участками удаляемого элемента, по которым ген kan, фланкированный FRT-сайтами, в ходе гомологичной рекомбинации встраивался в геном вместо удаляемого элемента с помощью накопленной в клетках рекомбиназы. После трансформации клетки культивировали при 37°C в течение 2 ч с аэрацией, а затем в течение 2 ч без аэрации. Скрининг мутантов проводили на плотной среде ЛБ с канамицином, используя праймеры для верификации (табл. 2). ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле [31], ДНК-маркер – GeneRuler 1 kb Plus (“Thermo Fisher Scientific”).

Полученные мутантные штаммы использовали для получения электрокомпетентных клеток, которые затем трансформировали плазмидой pCP20, кодирующей Flp-рекомбиназу. Эта рекомбиназа, узнающая FRT-сайты, вырезала ген kan из генома. Протокол приготовления электрокомпетентных клеток был таким же, как для нативного штамма. Трансформанты культивировали на плотной среде ЛБ с хлорамфениколом при 30°C.

Для элиминации плазмиды pCP20 из мутантных штаммов бактерии культивировали на плотной среде ЛБ без антибиотиков при 42°C. Колонии мутантов, утративших устойчивость ко всем трем антибиотикам, использовали для подтверждения инактивации с помощью ПЦР с праймерами для верификации (табл. 2).

**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты проводили 3–5 раз по три

**Таблица 1.** Праймеры для инактивации, использованные в работе

| Ген/оперон                    | Праймер       | Нуклеотидная последовательность*                                           | T, °C |
|-------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>fimH</i>                   | Ko.fH.ina f   | aagaggaatgaaaaaatagtcaccctgttgtaac<br>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC                 | 63.5  |
|                               | Ko.fH.ina r   | ttattcgtaacaaagggtactccgataattgactg<br>ATGGGAATTAGCCATGGTCC                |       |
| <i>mrkD</i><br>(обе копии)    | Ko.mD.ina f   | agtcaggaaaaaacaaaggaaacgctatgtcgctaa<br>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC               | 62.0  |
|                               | Ko.mD.ina r   | caattgtgctgaatcacgcataccgcctcccgaat<br>ATGGGAATTAGCCATGGTCC                |       |
| <i>fim</i>                    | Ko.fim.ina f  | atgaacaaattagccgttatctgttttcagcactgttcctgagcgctacGTGTAGGCTGGAG<br>CTGCTTC  | 64.5  |
|                               | Ko.fim.ina r  | ctacactcgcgatccggactgcggctccgcttcgctgagagctccgccaATGGGAATTAGC<br>CATGGTCC  |       |
| <i>mrk1</i><br>(первая копия) | Ko.mrk1.ina f | atgaaaaaggttctctctctgctgcaatggcgactgcggttttttggtatGTGTAGGCTGGAGC<br>TGCTTC | 65.5  |
|                               | Ko.mrk1.ina r | tcaattataacaaagttcccaggtcgccagctggtcaacggaccgctggATGGGAATTAGCC<br>ATGGTCC  |       |
| <i>mrk2</i><br>(вторая копия) | Ko.mrk2.ina f | gcggcaaatgctgctgataccaatgtaggcggcggtcaggttaattcttGTGTAGGCTGGAG<br>CTGCTTC  | 66.0  |
|                               | Ko.mrk2.ina r | tcgctttttccggcgctggcgtaacgtagccaatgtaataagtaaatatcATGGGAATTAGCCA<br>TGGTCC |       |

\* Нижний регистр обозначает выступы целевого гена/оперона.

Таблица 2. Праймеры для верификации мутантов, использованные в работе

| Сайт амплификации     | Праймер      | Нуклеотидная последовательность | T, °C |
|-----------------------|--------------|---------------------------------|-------|
| Фланкирующие праймеры |              |                                 |       |
| fimH                  | Ko.fH f      | GGAACGATCCAGGCGGTGAT            | 56.0  |
|                       | Ko.fH r      | CGACAGGATGCAGTCGACCT            | 56.0  |
| mrkD                  | Ko.mD f      | GAAGGCCACGGTTAAGTGGGA           | 54.0  |
|                       | Ko.mD r      | AGGGCCAGTTGAATGAGTCG            | 54.0  |
| fim                   | Ko.fim f     | AGCATTGCTTCAGGATTATT            | 50.0  |
|                       | Ko.fim r     | ATCCTTGATGAAGTGAATTGT           | 50.0  |
| mrk1                  | Ko.mrk1 f    | TGCTCATTGATACTTAATTC            | 51.0  |
|                       | Ko.mrk1 r    | ATTGTAACATTTGCGCAAGA            | 50.0  |
| mrk2                  | Ko.mrk2 f    | ATCCATAAAACAGTCTCAAT            | 52.0  |
|                       | Ko.mrk2 r    | TTAATGCAAAAAGATTCTGG            | 51.0  |
| Внутренние праймеры   |              |                                 |       |
| fimH/fim              | Ko.inn.fH f  | CGGTTTCATTAATCGCGGTCC           | 54.0  |
| mrkD                  | Ko.inn.mD f  | ACGGCAATAACCCGATCCTC            | 54.0  |
| mrk1/mrk2             | Ko.inn.mrk f | TATTCTCGCCGGAAAGCGGC            | 56.0  |
| kan                   | K2 f         | CGGTGCCCTGAATGAAGTGC            | 56.0  |
|                       | K1 r         | CAGTCATAGCCGAATAGCCT            | 52.0  |

повторности в каждой серии. Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего. Статистическую обработку проводили с помощью программы PSPP-1.4.1-g79ad47. Данные сравнивали с использованием непарного двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*K. oxytoca* NK-1 обладает способностью к адгезии к широкому кругу субстратов

Культура штамма NK-1, выращенная при 37°C, вызывала умеренную агглютинацию клеток дрожжей (++), которая подавлялась маннозой (+), что указывает на продукцию бактериями чувствительных и нечувствительных к маннозе фимбрий типов 1 и 3 соответственно.

В то же время, культивирование бактерий при 30°C приводило к снижению агглютинации дрожжей (+), которая при этом не изменялась при добавлении маннозы, что указывало на наличие на поверхности бактерий, выращенных в данных условиях, лишь фимбрий типа 3. Таким образом, температура культивирования влияет на продукцию штаммом NK-1 фимбрий типа 1 и 3. Для дальнейшей характеристики адгезивных свойств бактерии культивировали при 37°C.

Адгезивный потенциал штамма был охарактеризован на разных биотических и абиотических поверхностях. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что бактерии эффективно адгезируют как к линии клеток 5637 эпителия мочевого пузыря (рис. 1а), так и к стеклу (рис. 1б). Количественная оценка адгезии также подтвердила способность штамма адгезировать к биотическим и абиотическим поверхностям.

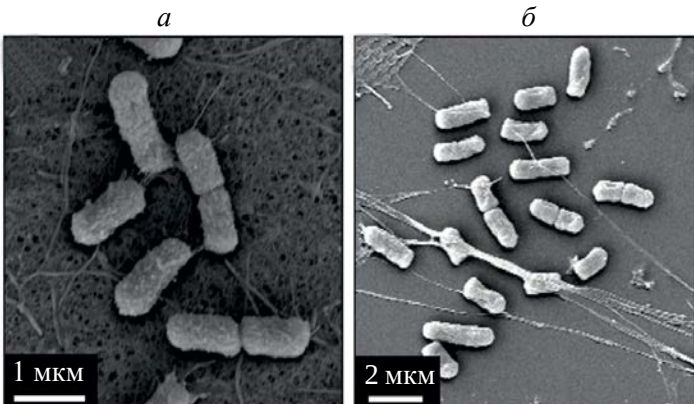


Рис. 1. Адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1. С помощью сканирующей электронной микроскопии (увеличение 15000× и 2000×) показано, что бактерии способны адгезировать как к живым клеткам эпителия мочевого пузыря 5637 (а), так и к стеклу (б).

Так, уровень адгезии штамма к клеткам эпителия кишечника Сасо-2, легких H1299 и мочевого пузыря 5637 составлял  $2100 \pm 100$ ,  $1500 \pm 100$  и  $450 \pm 30$  КОЕ/мм<sup>2</sup> соответственно. На разных абиотических субстратах адгезивность штамма была примерно одинаковой, составляя  $23000 \pm 3000$  бактерий/мм<sup>2</sup> на РНКазе В,  $17000 \pm 3000$  бактерий/мм<sup>2</sup> на БСА и столько же на полистироле без адсорбированных белков. Адгезия штамма к РНКазе В, богатой остатками маннозы, может объясняться продукцией фимбрий типа 1, адгезин которых (FimH) специфически связывает маннозиллированные белки [32]. В свою очередь, фимбрии типа 3 участвуют в неспецифической адгезии и могут быть фактором эффективной адгезии штамма NK-1 к БСА и полистиролу [33, 34].

#### Геном *K. oxytoca* NK-1 кодирует фимбрии типа 1 и 3

С помощью BLAST-анализа в геноме *K. oxytoca* NK-1 обнаружены кластеры генов, участвующих в биогенезе фимбрий типа 1 и 3 (*fim*- и *mrk*-опероны соответственно) (рис. 2). Общими для этих оперонов являются следующие структурные гены:

– *fimA* и *mrkA*, кодирующие главную субъединицу тела фимбрий;

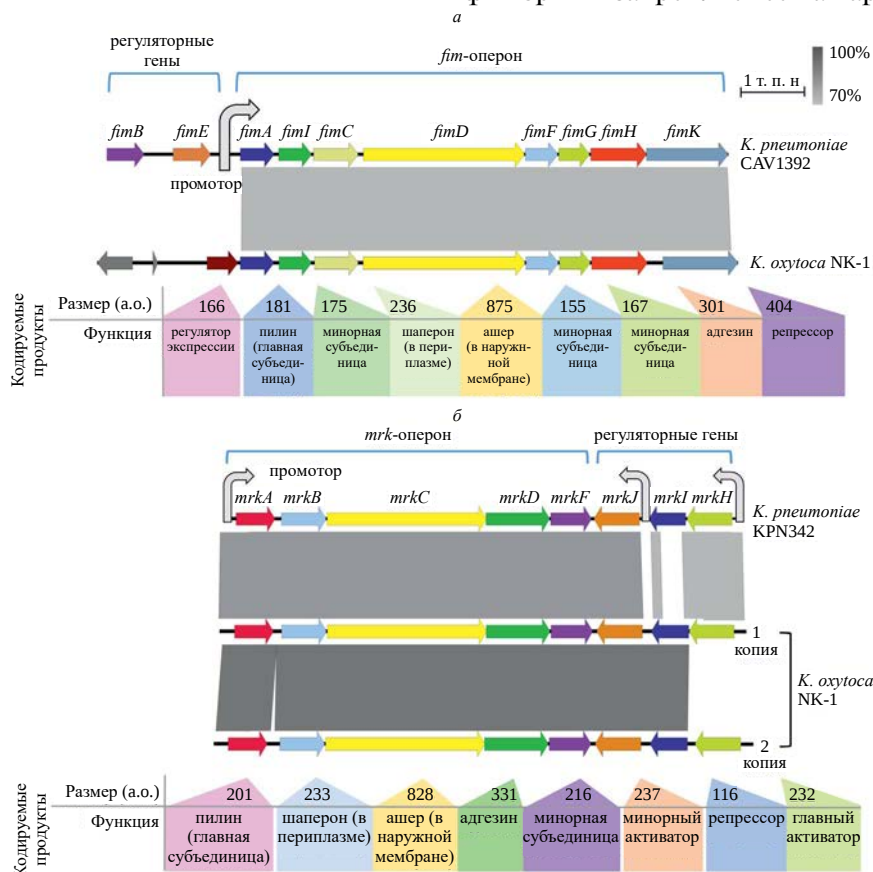
– *fimC* и *mrkB*, кодирующие шаперон, обеспечивающий фолдинг и транспорт субъединиц через периплазму;

– гены *fimD* и *mrkC* ашера, обеспечивающего сборку субъединиц на наружной мембране;

– гены *fimH* и *mrkD* адгезина, расположенного на дистальном конце тела фимбрии и обеспечивающего специфичное прикрепление бактерий.

Оперон фимбрий типа 1 (*fim*-оперон) представлен в геноме одной копией размером 8.05 т.п.н. Подобно *fim*-оперону *K. pneumoniae*, *fim*-оперон *K. oxytoca* NK-1 включает восемь генов: *fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimH* и следующие минорные гены:

– *fimI* с неохарактеризованной функцией. Имеющиеся данные позволяют предположить, что продукт этого гена терминирует сборку фимбрии и закрепляет ее на наружной мембране;



**Рис. 2.** Сравнительный анализ генных кластеров, ответственных за продукцию фимбрий типа 1 (а) или типа 3 (б), в геномах *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Под генами представлены гипотетические генные продукты в аминокислотных остатках (а.о.). Цветная шкала — степень идентичности сравниваемых генов.

— *fimF* и *fimG* — продукты этих генов закрепляют адгезин на теле фимбрии и контролируют ее длину;

— дополнительный ген *fimK* кодирует белок-репрессор экспрессии *fim*-оперона *Klebsiella* spp, отсутствующий у *Escherichia coli* [35, 36].

В то же время, в отличие от *K. pneumoniae*, перед *fim*-опероном *K. oxytoca* NK-1 вместо генов рекомбиназ *fimB* и *fimE*, меняющих ориентацию промотора и тем самым регулирующих экспрессию оперона [36], расположен ген гипотетического белка. Согласно проведенному нами BLAST-анализу, гомологи этого гена характерны только для членов видового комплекса *K. oxytoca*. С помощью программы ScanProsite в продукте данного гена выявлен структурный мотив “спираль-поворот-спираль”, характерный для ДНК-связывающих регуляторных белков [37]. Можно предположить, что экспрессия *fim*-оперона в клетках *K. oxytoca* и других членов видового комплекса *K. oxytoca* контролируется продуктом этого гена.

Оперон фимбрий типа 3 (*mrk*-оперон) в геноме *K. oxytoca* NK-1 представлен двумя копиями размером 5.58 и 5.65 т.п.н. (рис. 2б), нуклеотидная последовательность которых идентична на 94%. Структурно обе копии состоят из пяти генов, они идентичны *mrk*-оперону *K. pneumoniae* и, помимо уже упомянутых генов *mrkA*, *mrkB*, *mrkC*, *mrkD*, включают также минорный ген *mrkF*, продукт которого участвует в сборке и стабилизации фимбрий [38]. Экспрессия *mrk*-оперона контролируется прилежащим и расположенным на обратной цепи кластером регуляторных генов, который организован аналогично в соответствующих геномных локусах обеих бактерий и состоит из следующих генов: *mrkH* (главный активатор), *mrkI* (репрессор) и *mrkJ* (минорный активатор). Вместе с тем, нуклеотидные последовательности этих генов различаются. Так, обе копии гена *mrkJ* *K. oxytoca* гомологичны соответствующему гену *K. pneumoniae*. Обе копии гена *mrkI* *K. oxytoca* NK-1 гомологичны гену *mrkI* *K. pneumoniae* на 70% только в пределах 25% длины последовательности. Интересно отметить, что копии гена *mrkH* *K. oxytoca* не гомологичны друг другу по всей длине, лишь одна копия гена *mrkH* гомологична гену *mrkH* *K. pneumoniae* на 74%.

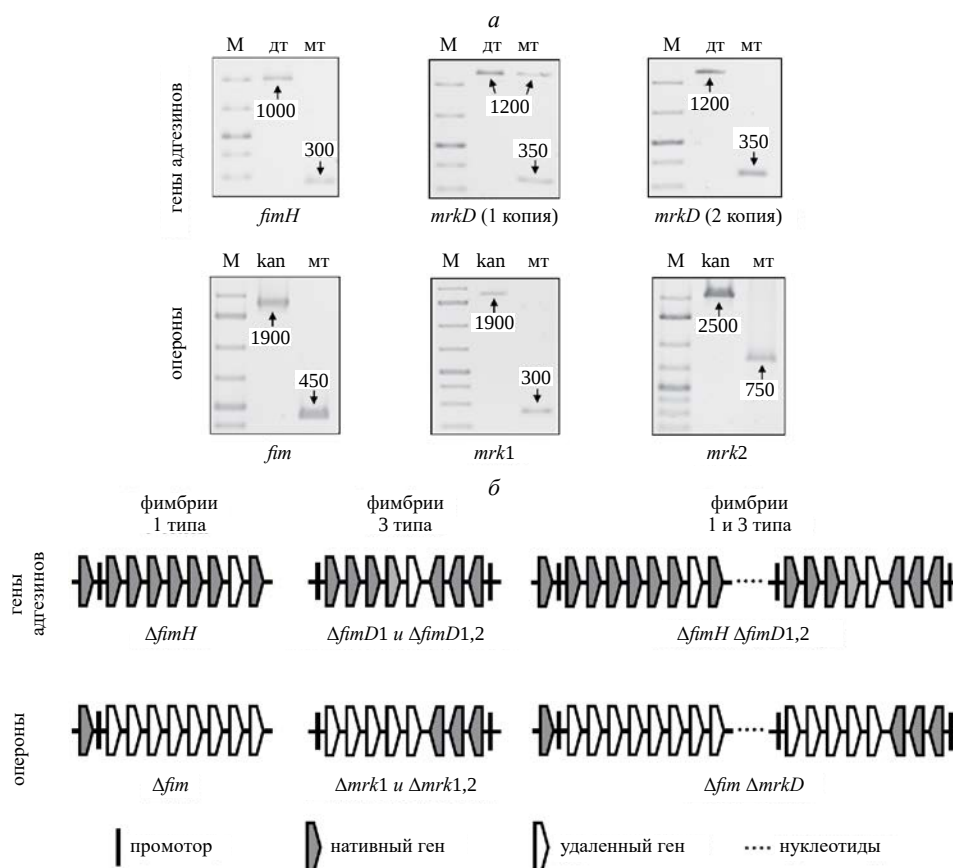
С целью изучения вклада фимбрий типа 1 и 3 в адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1 проведен нокаут генов адгезинов — *fimH* и *mrkD* соответственно. Чтобы исключить возможное влияние других структурных субъединиц фимбрий на адгезию и другие клеточные процессы, например, при накоплении в периплазме, мы инактивировали также целые опероны фимбрий типа 1 (*fim*) и типа 3 (*mrk*). Для полного нокаута

фимбрий типа 3 инактивировали вторую копию гена *mrkD* или оперона *mrk* у мутантов по первым копиям. Чтобы получить мутантов по обоим типам фимбрий, инактивировали ген адгезина или оперон фимбрий типа 1 у полных мутантов по фимбриям типа 3. В геноме мутантов вместо удаленного элемента оставался так называемый “шрам” меньшего размера, что подтверждено с помощью ПЦР (рис. 3а). На рис. 3б показана линейка мутантов с нокаутом генов отдельных адгезинов фимбрий типа 1 ( $\Delta$ *fimH*) или типа 3 ( $\Delta$ *mrkD1*,  $\Delta$ *mrkD1,2*), оперонов фимбрий типа 1 ( $\Delta$ *fim*) или типа 3 ( $\Delta$ *mrk1*,  $\Delta$ *mrk1,2*), а также генов адгезинов и оперонов фимбрий типа 1 и 3 одновременно ( $\Delta$ *fimH*  $\Delta$ *mrkD1,2* и  $\Delta$ *fim*  $\Delta$ *mrk1,2* соответственно).

#### Инактивация генов фимбрий типа 3 повышает адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия легких

Адгезивные свойства мутантных штаммов исследовали с помощью тех же клеточных линий, белков, адсорбированных на полистироле, и чистого полистирола. Согласно полученным результатам, инактивация генов адгезинов и оперонов обоих типов фимбрий не влияла на адгезию бактерий к абиотическим поверхностям (РНКазе В, БСА и полистиролу), а также к линиям клеток эпителия кишечника Сасо-2 и мочевого пузыря 5637 (рис. 4а). Однако на клетках эпителия легких Н1299 адгезия мутантов по генам фимбрий типа 3 неожиданно повышалась; и этот эффект усиливался при последующем удалении генов фимбрий типа 1 у данного мутанта. Необходимо отметить, что инактивация только генов фимбрий типа 1 не влияла на адгезию бактерий. При этом фенотип мутантов по генам адгезинов не отличался от фенотипа мутантов по целым оперонам, что позволяет сделать вывод о том, что наблюдаемый эффект действительно вызван отсутствием в геноме детерминант адгезинов фимбрий типа 3. Так, уровень адгезии мутантов по одной копии гена адгезина  $\Delta$ *mrkD1* или оперона  $\Delta$ *mrk1* к клеткам линии Н1299 повышался относительно дикого типа на  $34 \pm 10$  и  $30 \pm 5\%$ , соответственно, мутантов по обоим генам адгезина ( $\Delta$ *mrkD1,2*) и оперонов ( $\Delta$ *mrk1,2*) — на  $79 \pm 7$  и  $87 \pm 4\%$ , а мутантов по фимбриям типа 1 и 3 одновременно, то есть по генам адгезинов  $\Delta$ *fimH*  $\Delta$ *mrkD1,2* и оперонам  $\Delta$ *fim*  $\Delta$ *mrk1,2* — на  $129 \pm 12$  и  $140 \pm 13\%$  соответственно (рис. 4а).

Инактивация фимбрий типа 1 не влияет на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия кишечника и легких, а инактивация фимбрий типа 3 не влияет на адгезию к клеткам эпителия кишечника и мочевого пузыря, что согласуется с данными, описывающими колонизирующую

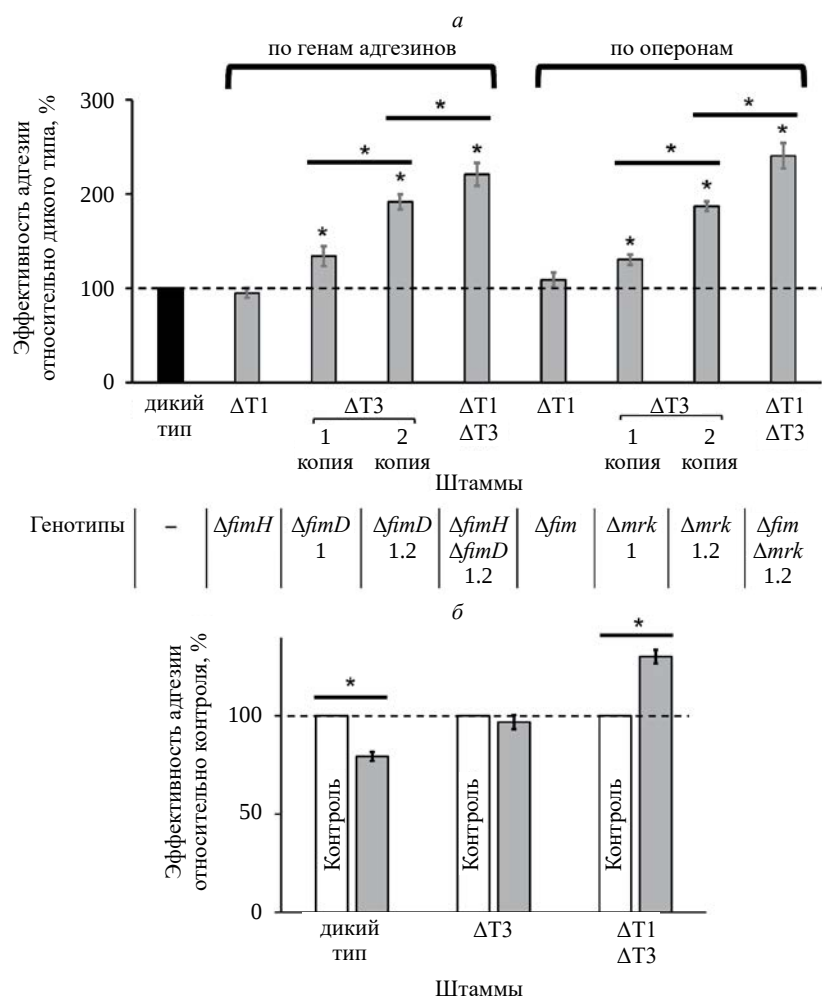


**Рис. 3.** Верификация мутантных штаммов *K. oxytoca* NK-1 (а) и схематичное изображение генотипов полученных мутантов (б). Генетические детерминанты фимбрий типа 1 и 3, которые обеспечивают адгезию энтеробактерий к биотическим и абиотическим поверхностям, инактивированы. Элиминацию генов адгезинов или целых оперонов фимбрий подтверждали с помощью ПЦР, используя пары праймеров к удаляемым элементам генома: генам адгезинов *fimH* и *mrkD*, оперонам *fim*, *mrk1* и *mrk2*. Размеры амплификатов (п.н.), определенные с помощью электрофореза в агарозном геле, указаны на электрофореграммах. М — ДНК-маркер, дт — дикий тип, кан — мутантный тип до элиминации гена устойчивости к канамицину, мт — мутантный тип.

способность *K. pneumoniae* в модели инфекции у мышей [39]. Однако полученные нами данные об отсутствии эффекта инактивации фимбрий на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к полистиролу и клеткам эпителия мочевого пузыря отличаются от данных для *K. pneumoniae* [39, 40]. Так, инактивация фимбрий типа 1 или 3 негативно влияла на способность *K. pneumoniae* колонизировать мочевой пузырь и катетер в мышинной модели КАИМП [40]. Кроме того, инактивация фимбрий типа 3 подавляла способность *K. pneumoniae* к формированию биопленок на абиотической поверхности — процессу, ключевым этапом которого является неспецифическое прикрепление бактерий [39]. В то же время, в отличие от показанной нами повышенной адгезии мутанта *K. oxytoca* по фимбриям типа 3 к клеткам эпителия легких, аналогичная мутация у *K. pneumoniae* никак не сказывалась на способности бактерий колонизировать легкие мышей [39].

Мы предполагаем, что отсутствие влияния инактивации фимбрий типа 1 или 3 на адгезию бактерий к определенным субстратам связано с тем, что их удаление меняет белковый профиль внешней мембраны и в свою очередь вызывает стресс клеточной оболочки, на который бактериальная клетка реагирует компенсаторной экспрессией генов других адгезинов, в частности, сверхэкспрессией адгезинов, тропных к клеточной линии H1299 эпителия легких. Установлено, что у грамотрицательных бактерий реакция клеточной оболочки на стресс обеспечивается двухкомпонентной сигнальной системой Срх, которая контролирует экспрессию многих генов, в том числе оперонов фимбрий [41, 42].

Компенсаторная экспрессия фимбриальных генов осуществляется за счет механизмов координированной регуляции на уровне как локальных, так и глобальных регуляторов и направлена на предотвращение биогенеза одновременно нескольких типов фимбрий для



**Рис. 4.** Адгезивные фенотипы мутантов с инактивированными фимбриями типов 1 и/или 3. Чтобы оценить влияние инактивации фимбрий на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия легких H1299 (а), эффективность адгезии (%) каждого мутантного штамма рассчитывали как соотношение уровней адгезии мутантного штамма и штамма дикого типа, принятого за 100%. Чтобы оценить влияние маннозы на адгезию штаммов дикого типа и мутантов (б), рассчитывали эффективность адгезии (%) каждого штамма — отношение уровня адгезии после обработки маннозой (опыт) к уровню адгезии до обработки, принятому за 100% (контроль). \* $p < 0.05$ .

снижения энергозатрат [43, 44]. Это показано, например, для S-, P-, F1C-фимбрий и фимбрий типа 1 *E. coli* [45]. В ходе BLAST-анализа мы обнаружили в геноме *K. oxytoca* NK-1 еще три гипотетических гомолога оперонов шаперон-ашерных фимбрий из 10, описанных у *K. pneumoniae* [46, 47]: Кра, Kpg и Esp. Таким образом, адгезивный профиль мутантных штаммов *K. oxytoca* может объясняться компенсаторной экспрессией данных оперонов или других генов адгезинов, еще не идентифицированных.

Возможно также, что функциональные особенности фимбрий типа 1 и 3 *K. oxytoca* не обеспечивают их специфичность, характерную для соответствующих фимбрий у *K. pneumoniae*, а именно, адгезию к клеткам эпителия мочевого пузыря, гликопротеинам, БСА и полистиролу.

Поскольку у *K. pneumoniae* экспрессия оперонов фимбрий типа 1 и 3 подвержена компенсаторной регуляции [48], мы предположили, что сверхадгезивность мутанта *K. oxytoca* NK-1 по фимбриям типа 3 может быть связана с гиперпродукцией фимбрий типа 1. Чтобы понять это, мы исследовали влияние маннозы на адгезивные свойства мутантных штаммов. Поскольку адгезивный фенотип мутантов по генам адгезинов не отличался от фенотипа мутантов по целым оперонам соответствующих фимбрий (рис. 4а), в данном эксперименте использовали только мутантов по генам адгезинов. Перед адгезией бактерии (дикого типа и мутантные) обрабатывали 0.2 М маннозой и рассчитывали эффективность адгезии каждого штамма как отношение адгезии обработанных бактерий к адгезии необработанных, принятой за 100% (контроль). Манноза положительно влияла

на адгезивность мутантов с одновременно инактивированными генами адгезинов обоих типов фимбрий в отношении клеток эпителия легких (рис. 4б). Обработка штамма дикого типа маннозой незначительно снижала его адгезивность — остаточная адгезия составляла  $79 \pm 2\%$  от контроля. Наблюдаемый эффект может быть связан с функционированием маннозачувствительных фимбрий типа 1. Интересно отметить, что манноза не влияла на адгезию мутанта по адгезинам фимбрий типа 3 ( $\Delta mrkD1,2$ ) и неожиданно повышала адгезию мутанта по адгезинам фимбрий обоих типов ( $\Delta fimH \Delta mrkD1,2$ ) на  $30 \pm 3\%$  относительно контроля.

Согласно одной из разновидностей механизма РНК-интерференции [49], трансляция мРНК генного кластера *mrkHII*, расположенного на противоположной цепи после оперона фимбрий типа 3 и кодирующего его регуляторы, в нативном состоянии может быть частично подавлена за счет гибридизации 5'-удлиненного конца его транскрипта с 3'-удлиненным концом транскрипта *mrk*-оперона. В случае инактивации промотора фимбриальных генов можно было бы допустить, что измененный фенотип мутантов по фимбриям типа 3 вызван частичной депрессией кластера *mrkHII*, обусловленной отсутствием *mrk*-транскрипта, и, как следствие, изменением экспрессии других гипотетических генов адгезинов, перекрестными регуляторами которых являются продукты *mrkHII*. Тем не менее, поскольку инактивация была направлена лишь на структурные гены оперона и не затрагивала промоторы и регуляторные гены, депрессия *mrkHII*-кластера возможна лишь у мутанта по целым *mrk*-оперонам (ввиду полного отсутствия транскрипта), но не у мутанта по генам адгезинов *mrkD* — в этом случае продолжалось бы частичное подавление. Поскольку адгезивные фенотипы мутантов по генам адгезинов *mrkD* и целым *mrk*-оперонам не различались, мы не можем однозначно говорить о вкладе генов-регуляторов *mrk*-оперона в экспрессию других адгезинов.

Согласно опубликованным данным, манноза усиливает экспрессию генов вирулентности энтеробактерии *Edwardsiella piscicida*, патогенной для рыб, за счет связывания и активации маннозависимого активатора транскрипции [50]. В геноме *K. oxytoca* нами обнаружен ген, на 73% идентичный этому гену-активатору, что позволяет предположить возможность его экспрессии в рамках ответа оболочки *K. oxytoca* на стресс, связанный с удалением фимбрий типа 3 или одновременно типов 1 и 3. В присутствии экзогенной маннозы это усиливает экспрессию генов адгезинов, тропных к клеткам эпителия легких.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что адгезивный аппарат *K. oxytoca* NK-1 характеризуется многообразием компонентов, которые обеспечивают адгезию к широкому кругу субстратов и способны заменять друг друга. Это осуществляется благодаря перекрестной регуляции экспрессии соответствующих генов и обеспечивает быструю и эффективную адаптацию бактерий к разным экологическим нишам. В частности, высокий природный потенциал штамма *K. oxytoca* NK-1 к адгезии на клетках эпителия легких повышается при инактивации фимбрий типа 3, и этот эффект усиливается при одновременном отсутствии фимбрий типов 1 и 3, а также в присутствии экзогенной маннозы. Это радикально отличается от эффекта, наблюдаемого после аналогичных манипуляций с фимбриальными генами у близкородственного вида — *K. pneumoniae*, что может свидетельствовать об отличиях в регуляции механизмов адгезии у *K. oxytoca*. Учитывая возрастающую клиническую значимость *K. oxytoca*, важной представляется роль факторов, контролирующей функционирование фимбрий типа 3, которые обладают потенциальной способностью индуцировать компенсаторную сверхэкспрессию генов других адгезинов. Чтобы понять, как это может сказаться на патогенезе инфекций и, в первую очередь, пневмонии, необходимо дальнейшее изучение способности мутантов колонизировать легочный эпителий на животной модели, поскольку адгезины, обеспечивающие повышенную адгезию бактерий *in vitro*, могут служить антигенами для развития иммунного ответа *in vivo* в богатой фагоцитами легочной среде и тем самым ускорять элиминацию патогенов. Кроме того, для идентификации структур, обеспечивающих повышенную адгезию мутантов, требуется проведение транскриптомного и протеомного анализа. Таким образом, полученные нами данные поднимают вопросы о механизмах адгезии условно-патогенных бактерий *K. oxytoca* и приоткрывают новые перспективы в дальнейшем поиске мишеней для патоблокаторов и вакцин, контроля инфекций, вызванных этими возбудителями.

Мы благодарим доктора Rafał Kolenda, сотрудника лаборатории многопараметрического анализа Бранденбургского технического университета Cottbus-Senftenberg (Германия), за предоставление плазмид, использованных в работе.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang J., Long H., Hu Y., Feng Y., McNally A., Zong Z. (2022) *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, e0000621.
2. Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. (2014) *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* **6**, 64.
3. Herzog K.A., Schneditz G., Leitner E., Feierl G., Hoffmann K.M., Zollner-Schwetz I., Krause R., Gorkiewicz G., Zechner E.L., Högenauer C. (2014) Genotypes of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients with nosocomial pneumonia are distinct from those of isolates from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1607–1616.
4. Cosic A., Leitner E., Petternel C., Galler H., Reinthaler F.F., Herzog-Obereder K.A., Tatscher E., Raffl S., Feierl G., Högenauer C., Zechner E.L., Kienesberger S. (2021) Variation in accessory genes within the *Klebsiella oxytoca* species complex delineates monophyletic members and simplifies coherent genotyping. *Front. Microbiol.* **12**, 692453.
5. Sibi G., Kumari P. Kabungulundabungi N. (2014) Antibiotic sensitivity pattern from pregnant women with urinary tract infection in Bangalore, India. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **7S1**, S116–S120.
6. Singh L., Cariappa M.P., Kaur M. (2016) *Klebsiella oxytoca*: an emerging pathogen? *Med. J. Armed Forces India.* **72S1**, S59–S61.
7. Papajk J., Mezerová K., Uvízl R., Štosová T., Kolář M. (2021) Clonal diversity of *Klebsiella* spp. and *Escherichia* spp. strains isolated from patients with ventilator-associated pneumonia. *Antibiotics.* **10**, 674.
8. Neog N., Phukan U., Puzari M., Sharma M., Chetia P. (2021) *Klebsiella oxytoca* and emerging nosocomial infections. *Curr. Microbiol.* **78**, 1115–1123.
9. Yang J., Long H., Hu Y., Feng Y., McNally A., Zong Z. (2022) *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, e0000621.
10. Han Y., Jia Z., Shi J., Wang W., He K. (2022) The active lung microbiota landscape of COVID-19 patients through the metatranscriptome data analysis. *Bioimpacts.* **12**, 139–146.
11. Maebed A.Z.M., Gaber Y., Bakeer W., Dishisha T. (2021) Microbial etiologies of ventilator-associated pneumonia (VAP) in intensive care unit of Beni-Suef University's Hospital. *Beni Suef Univ. J. Basic. Appl. Sci.* **10**, 41.
12. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K., National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 996–1011.
13. Choi M., Tennant S.M., Simon R., Cross A.S. (2019) Progress towards the development of *Klebsiella* vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* **18**, 681–691.
14. Lau W.Y.V., Taylor P.K., Brinkman F.S.L., Lee A.H.Y. (2023) Pathogen-associated gene discovery workflows for novel antivirulence therapeutic development *EBioMedicine.* **88**, 104429.
15. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Ksiazczyk M., Bugla-Ploskonska G., Choroszy-Krol I. (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut. Pathog.* **11**, 10.
16. Mol O., Oudega B. (1996) Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 25–52.
17. Jin X., Marshall J.S. (2020) Mechanics of biofilms formed of bacteria with fimbriae appendages. *PLoS One.* **15**, e0243280.
18. Waksman G., Hultgren S.J. (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 765–774.
19. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. (1991) Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1795–1800.
20. Ghasemian A., Mobarez A.M., Peerayeh S.N., Bezmin Abadi A.T. (2018) The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes New Infect.* **27**, 36–39.
21. Podschun R., Heinen P., Sonntag H.G. (1987) Haemagglutinins and adherence properties to HeLa and intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg A.* **263**, 585–593.
22. Würker M., Beuth J., Ko H.L., Przondo-Mordarska A., Pulverer G. (1990) Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralbl. Bakteriol.* **274**, 239–245.
23. Chan W.T., Verma C.S., Lane D.P., Gan S.K. (2013) A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci. Rep.* **33**, e00086.
24. Duguid J.P. (1959) Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 271–286.

25. Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6640–6645.
26. Doublet B., Douard G., Targant H., Meunier D., Madec J.Y., Cloeckaert A. (2008) Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J. Microbiol. Meth.* **75**, 359–361.
27. Aberg A., Shingler V., Balsalobre C. (2006) (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol. Microbiol.* **60**, 1520–1533.
28. Ali R., El-Boubbou K., Boudjelal M. (2021) An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*. **8**, 101521.
29. Giliazeva A.G., Shagimardanova E.I., Shigapova L.H., Pudova D.S., Sharipova M.R., Mardanova A.M. (2019) Draft genome sequence and analysis of *Klebsiella oxytoca* strain NK-1 isolated from ureteral stent. *Data Brief*. **24**, 103853.
30. Khetrapal V., Mehershahi K., Rafee S., Chen S., Lim C.L., Chen S.L. (2015) A set of powerful negative selection systems for unmodified *Enterobacteriaceae*. *Nucl. Acids Res.* **43**, e83.
31. Wagner M. (1964) Eine Methode für den direkten Nachweis von Desoxyribonukleasen nach Elektrophorese in Agar. *J. Chromatogr.* **14**, 107–108.
32. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. (1992) Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect. Immun.* **60**, 1577–1588.
33. Jagnow J., Clegg S. (2003) *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology (Reading)*. **149**, 2397–2405.
34. Bulard E., Fontaine-Aupart M.P., Dubost H., Zheng W., Bellon-Fontaine M.N., Herry J.M., Bourguignon B. (2012) Competition of bovine serum albumin adsorption and bacterial adhesion onto surface-grafted ODT: *in situ* study by vibrational SFG and fluorescence confocal microscopy. *Langmuir*. **28**, 17001–17010.
35. Schwan W.R. (2011) Regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **1**, 17–25.
36. Venkitapathi S., Wijesundara Y.H., Cornelius S.A., Herbert F.C., Gassensmith J.J., Zimmermann P.E., De Nisco N.J. (2022) Conserved FimK truncation coincides with increased expression of type 3 fimbriae and cultured bladder epithelial cell association in *Klebsiella quasipneumoniae*. *J. Bacteriol.* **204**, e0017222.
37. Aravind L., Anantharaman V., Balaji S., Babu M.M., Iyer L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231–262.
38. Huang Y.J., Liao H.W., Wu C.C., Peng H.L. (2009) MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **160**, 71–79.
39. Schroll C., Barken K.B., Krogfelt K.A., Struve C. (2010) Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**, 179.
40. Murphy C.N., Mortensen M.S., Krogfelt K.A., Clegg S. (2013) Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* **81**, 3009–3017.
41. Cho T.H.S., Wang J., Raivio T.L. (2022) NlpE is an OmpA-associated outer membrane sensor of the Cpx envelope stress response. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi: 10.1101/2022.10.18.512811
42. Hunke S., Keller R., Müller V.S. (2012) Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 12–22.
43. Müller C.M., Aberg A., Strasevičiene J., Emody L., Uhlin B.E., Balsalobre C. (2009) Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog.* **5**, e1000303.
44. Zhang H., Susanto T.T., Wan Y., Chen S.L. (2016) Comprehensive mutagenesis of the *fimS* promoter regulatory switch reveals novel regulation of type 1 pili in uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 4182–4187.
45. Snyder J.A., Haugen B.J., Lockatell C.V., Maroncle N., Hagan E.C., Johnson D.E., Welch R.A., Mobley H.L. (2005) Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**, 7588–7596.
46. Wu C.C., Huang Y.J., Fung C.P., Peng H.L. (2010) Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology (Reading)*. **156**(Pt 7), 1983–1992.
47. Zhou K., Lokate M., Deurenberg R.H., Arends J., Lo-Ten Foe J., Grundmann H., Rossen J.W., Friedrich A.W. (2015) Characterization of a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain assigned to a novel sequence type (1427). *Front. Microbiol.* **6**, 1250.
48. Stahlhut S.G., Struve C., Krogfelt K.A., Reisner A. (2012) Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 350–359.
49. Fire A.Z. (2007) Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* **14**, 1998–2012.
50. Wei L., Qiao H., Sit B., Yin K., Yang G., Ma R., Ma J., Yang C., Yao J., Ma Y., Xiao J., Liu X., Zhang Y., Waldor M.K., Wang Q. (2019) A bacterial pathogen senses host mannose to coordinate virulence. *iScience*. **20**, 310–323.

## Inactivation of Type 3 Fimbriae Increases Adhesion of *Klebsiella oxytoca* to Lung Epithelial Cells

A. G. Giliyazeva<sup>1, \*</sup>, A. M. Mardanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

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

*Klebsiella oxytoca* is a causative agent of various community-acquired and nosocomial infections in humans, including urinary tract infections, nosocomial pneumonia, antibiotic-associated diarrhea, etc. However, the virulence factors of this species have not been sufficiently studied. In this study, we characterized the adhesive potential of the urological isolate *K. oxytoca* NK-1 using different substrates. Our findings indicate that this strain effectively adheres to epithelial cell lines, glycosylated and non-glycosylated proteins and polystyrene. Furthermore, it induces yeast agglutination, indicating the presence of type 1 and type 3 fimbriae — organelles that facilitate the adhesion of enterobacteria to a diverse range of substrates. Both type 1 and type 3 fimbrial operons were identified in the strain's genome, with the latter presented in two copies. Mutants with inactivated genes encoding these fimbriae were constructed. It has been shown that the inactivation of type 1 fimbrial genes does not affect bacterial adhesion, while the inactivation of type 3 fimbrial genes increases the adhesion of *K. oxytoca* NK-1 to lung epithelial cells (line H1299), with mannose serving as an additional inducer of the increased adhesion. At the same time, the adhesion of this mutant to other substrates is not affected. These findings lead us to the conclusion that the adhesive apparatus of *K. oxytoca* is multifactorial. Additionally, they suggest the possibility of compensatory expression or overexpression of genes encoding alternative adhesins in the absence of types 1 and/or 3 fimbriae.

**Keywords:** *Klebsiella oxytoca*, adhesion, type 1 and type 3 fimbriae, adhesin, inactivation of genes and operons, mannose, compensatory expression, hyperadhesive phenotype

УДК 577.29

## СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ КЛАСТЕРА ТРАНСГЛУТАМИНАЗ У БАЗАЛЬНОГО МНОГОКЛЕТОЧНОГО *Halisarca dujardinii* (ГУБКА)

© 2024 г. А. Д. Финошин<sup>а, \*</sup>, О. И. Кравчук<sup>а</sup>, К. В. Михайлов<sup>б, с</sup>,  
Р. Х. Зиганшин<sup>д</sup>, К. И. Адамейко<sup>а</sup>, В. С. Михайлов<sup>а</sup>, Ю. В. Люпина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>с</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

<sup>д</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ), Москва, 117997 Россия

\*e-mail: alexcolton@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 10.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Трансглутаминазы — ферменты, осуществляющие посттрансляционные модификации белков и участвующие в регуляции их активности. Впервые показано, что у базального многоклеточного, морской губки *Halisarca dujardinii*, гены трансглутаминаз организованы в кластер, как и у млекопитающих. Регуляторные области шести генов трансглутаминаз и особенности их экспрессии в разные периоды жизненного цикла *H. dujardinii* указывают на независимую регуляцию их экспрессии. Снижение активности трансглутаминаз, вызванное цистамином, повышает эффективность восстановления многоклеточной структуры губки после ее механической диссоциации. Впервые показано, что у базального многоклеточного снижение активности трансглутаминаз приводит к увеличению продукции активных форм кислорода. Изучение трансглутаминаз базального многоклеточного и других морских организмов важно для понимания эволюции и особенностей функционирования этих ферментов у высших животных.

**Ключевые слова:** трансглутаминазы, *Halisarca dujardinii*, агрегация, цистамин, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0026898424050094, EDN: HULTXR

### ВВЕДЕНИЕ

Трансглутаминазы (TGM) — семейство структурно и функционально родственных ферментов, которые катализируют реакции включения амина в остатки глутамина и образование изопептидной связи между остатками глутамина и лизина.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые TGM животных [1], грибов [2] и растений [3] выполняют множество важных функций, таких как поддержание целостности мембран и внутриклеточного матрикса, регуляция клеточной адгезии и модуляция передачи сигнала [4]. TGM участвуют в регуляции активности белков-мишеней с помощью различных посттрансляционных модификаций, включая сшивание белков, аминилирование,

гидролиз с конверсией остатка Gln в Glu [5]. Показано участие TGM в регуляции развития эмбрионов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных [6, 7]. Бактериальные TGM не относятся к  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым ферментам, они обладают низкой гомологией с TGM животных и менее специфичны [8]. Бактериальные TGM находят широкое применение в производстве различных продуктов питания, включая рыбные и мясные [9, 10], а также в создании капсул для лекарственных средств [11] и производстве био-разлагаемого пластика [12].

Геном человека содержит девять генов TGM: *TGM1*, *TGM2*, *TGM3*, *TGM4*, *TGM5*, *TGM6*,

*TGM7*, ген фактора свертываемости крови *FXIIIa (F13A)* и ген мембранного белка 4.2 (*EPB42*). Эти гены кодируют восемь каталитически активных и одну неактивную (*EPB42*) изоформу TGM. Изоформы TGM млекопитающих экспрессируются в различных тканях под контролем многоуровневой регуляции [13, 14]. TGM1 представлена в эпителиальных тканях [4, 15, 16]. TGM2 широко распространена в различных клетках и тканях [17]. TGM3 присутствует в волосяном фолликуле, эпидермисе и головном мозге [4], а TGM4 в предстательной железе и ее жидкостях, включая семенную [18]. TGM5 экспрессируется в основном в кератиноцитах крайней плоти, слизистой оболочке эпителия и скелетных мышцах [19]. TGM6 и TGM7 локализованы в семенниках и легких [4]. F13A находится в плазме и является одним из компонентов каскада свертывания крови [20]. EPB42 не обладает каталитической активностью, входит в состав мембраны эритроцитов, где участвует в поддержании ее целостности [21].

У беспозвоночных не найдено большого количества тканеспецифичных изоформ TGM. Клетки ракообразного *Pacifastacus leniusculus* содержат две изоформы TGM [22]. У *Drosophila melanogaster* обнаружены две изоформы, которые кодирует один ген (FlyBase ID: FBgn0031975). Обе изоформы функционируют и как внутриклеточные, и как внеклеточные [1]. У морского ежа *Paracentrotus lividus* [7], асцидии *Ciona intestinalis* [23], полихеты [24], гребневиков и губки *Amphimedon queenslandica* [25] найдена только одна изоформа TGM.

В регуляции экспрессии генов TGM у млекопитающих участвует индуцируемый гипоксией фактор (HIF-1, Hypoxia-Inducible Factor 1). Экспрессия гена *TGM1* в легких увеличивается при гипоксии и регулируется фактором HIF-1 с участием мотива HRE (Hypoxia-responsive element) [26]. Кроме HRE, промотор гена *TGM1* содержит мотивы связывания транскрипционных факторов, участвующих в ответе на гипоксию: AP1, AP2, CREB/AP1 и SP1 [26]. В состав промотора гена *TGM2* входят AP2-мотивы [4], а промоторов генов *TGM3* и *TGM4* – Sp1-мотив [4, 18]. Промотор гена *TGM5* содержит сайты связывания транскрипционных факторов AP1 и NF1 [19]. Экспрессия гена *F13A1* регулируется факторами NF1 и Sp1 [4].

Активность TGM связана с продукцией активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) [27], причем TGM могут быть основной мишенью для передачи сигналов ROS. Внутриклеточные ROS активируют TGM2 в некоторых клеточных линиях и снижают в других [28]. В клетках рака легкого и рака поджелудочной железы понижение активности TGM2 приводит

к повышению внутриклеточного уровня ROS [29, 30]. Однако в клеточной линии RBL2H3 лейкоза крыс активность TGM2 необходима для продукции ROS [31]. Активность TGM связана с содержанием ROS и в некоторых клетках беспозвоночных. Так, внеклеточная активность TGM в гемопоэтических клетках ракообразного *P. leniusculus* повышается при снижении уровня ROS, вызванного введением антиоксиданта [32]. Данные о функционировании TGM у базальных многоклеточных отсутствуют.

В качестве ингибиторов TGM *in vitro* и *in vivo* используют цистамин и цистеамин. В клеточной среде цистамин превращается в цистеамин, который, в свою очередь, действует на остатки цистеина в активном центре TGM [33, 34].

Губки (Porifera) – одна из древнейших линий животных, отделившаяся, вероятно, от филогенетического дерева многоклеточных еще до образования тканей. Тело губки представлено несколькими типами клеток, которые сохраняют плюрипотентность. Интересно, что представители типа Porifera способны к агрегации клеток после диссоциации тела и восстановлению функциональной структуры, то есть к регенерации в масштабе всего организма. Морские губки приливной зоны чрезвычайно устойчивы к изменению содержания кислорода в воде, они представляют собой уникальную модель для изучения процессов адаптации клеток к гипоксии [35]. Ранее нами было показано, что в процессе агрегации клеток губок происходит повышение уровня экспрессии нейтроглобина, белков, ответственных за обмен железа, а также транскрипционного фактора HIF [35, 36].

В представленной работе изучены функции белков TGM, экспрессия которых регулируется фактором гипоксии HIF1. Описано разнообразие изоформ TGM у морской губки *H. dujardinii*, показана их возможная роль в процессе агрегации клеток губки после диссоциации и связь активности TGM с продукцией ROS.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Образцы губок.** Губок *H. dujardinii* собирали в январе 2024 года при температуре воды +2...+5°C на субстрате (водорослях) в сублиторальной зоне Белого моря в районе д. Нильмогуба (координаты 66° 30.145' с.ш. 33° 07.765' в.д.), в месте, где отсутствует опреснение морской воды. К основным факторам, влияющим на содержание кислорода в морской воде, относятся фотосинтетическая активность водорослей и бактерий, температура воды и опреснение водами ручьев и рек. Все эти факторы изменяются в течение года. Концентрация растворенного кислорода в морской воде меняется в зависимо-

сти от температуры: снижается с мая по август при нагревании воды до +15... +17°C, тогда как осенью охлаждение воды до +6...+8°C приводит к росту концентрации кислорода. С другой стороны, в летний период содержание кислорода в воде увеличивается за счет деятельности фотосинтезирующих организмов, но при этом интенсифицируются также процессы гниения и окисления, которые влияют на метаболические процессы у водных животных. Использование в экспериментах губок зимнего периода, когда концентрация кислорода в воде стабильна, позволяет избежать влияния на их метаболизм фотосинтезирующих организмов и окислительных факторов. Клеточный состав губок в январе соответствует периоду начала оогенеза и сперматогенеза годового цикла *H. dujardinii* [37]. Особи *H. dujardinii* переносили на субстрате в аэрируемые аквариумы объемом 5 л с природной морской водой при +4°C и с соблюдением этих условий доставляли в ИБР РАН в течение 24 ч для экспериментов по реагрегации клеток в присутствии цистамина.

**Ингибирование транскриптаза (TGM).** TGM ингибировали цистамином (Cystamine Dihydrochloride, “Sigma-Aldrich”, США), который растворяли непосредственно перед экспериментом в стерильной морской воде и добавляли в чашки с клеточной суспензией губок до конечной концентрации 1, 5 и 25 мМ. Концентрации цистамина подбирали, исходя из кинетики ингибирования TGM человека цистамином [33]. Так, цистамин в концентрации 0.5 мМ снижал активность TGM в клеточной линии человека DU145 до 5%, а в концентрации 0.022 мМ подавлял активность рекомбинантной TGM2 на 50%. Клетки губок инкубировали с цистамином в течение 24 ч, после этого фотографировали агрегаты клеток или определяли содержание ROS.

**Реоагрегация в присутствии цистамина.** Эксперимент по реагрегации клеток губки проводили, как описано ранее [38, 39]. Губку механически диссоциировали на отдельные клетки и высевали в чашки Петри (“Sarstedt”, Германия) из расчета  $1 \times 10^7$  клеток на 2 мл морской фильтрованной воды. В экспериментальные чашки с клеточной суспензией добавляли цистамин (“Sigma-Aldrich”) до концентрации 1, 5 и 25 мМ, а в контрольные чашки вносили соответствующее количество фильтрованной морской воды. Клетки губок инкубировали в течение 24 ч при температуре +5°C. Съемку клеточных агрегатов производили в проходящем свете на микроскопе Leica DM RXA2 с камерой Olympus DP70. Изображения анализировали в программе ImageJ. Суточные агрегаты обводили вручную, площадь, периметр и округлость каждого агрегата вычис-

ляли по формуле: округлость =  $4\pi \times S/\sqrt{P}$ , где  $S$  — площадь агрегата, а  $P$  — его периметр.

**Обнаружение ROS.** ROS обнаруживали с помощью 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата ( $H_2DCFDA$ , “Lumiprobe”) в клеточной суспензии сразу после диссоциации губки и через 24 ч в агрегатах при температуре +5°C.  $H_2DCFDA$  (1 мкМ) добавляли за 30 мин до начала съемки. ROS регистрировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Carl Zeiss LSM 880 ЦКП ИБР РАН в режиме z-stack. Параметры возбуждения и эмиссии составляли 511 и 533 нм соответственно. Агрегаты обводили вручную, интенсивность флуоресценции оценивали, используя функцию “Гистограмма”. Значения интенсивности менее 15 (в шкале 0...255) исключали из анализа, как соответствующие фоновым значениям.

**Сборка транскриптома и анализ дифференциальной экспрессии генов.** Предсказание белковых продуктов генов TGM проводили с помощью программы TransDecoder v. 5.5 [40] на основе ранее полученной сборки транскриптома (NCBI, проект PRJNA594150) как описано ранее [39]. Полученные последовательности верифицировали с помощью выравнивания программой tblastn из пакета BLAST+ v.2.15 [41] на черновую сборку генома *H. dujardinii*, выполненную с помощью программ Masurca v. 4.10 [42][42] и Pilon v. 1.24 [43] (неопубликованные данные). Дифференциальную экспрессию генов губки в разные сезоны года анализировали согласно [39]. Экспрессию транскриптов (мРНК) рассчитывали после нормализации методом TMM (trimmed mean of M-values — усеченное среднее M-значений) в CPM (counts per million, число прочтений, отнесенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) с использованием программного обеспечения edgeR [44]. Статистическая модель edgeR для расчета уровня значимости учитывала сезон и стадию реагрегации. Долю ложноположительных результатов (*FDR*) контролировали методом Бенджамини–Хохберга: изменение экспрессии считали статистически значимым при *FDR* < 0.001.

**Филогенетический анализ TGM животных.** Набор последовательностей для филогенетического анализа TGM составлен на основе ортогрупп, реконструированных ранее с OrthoFinder v.2.5.5 [45]. Ортогруппа, соответствующая семейству TGM животных, была идентифицирована по белкам человека TGM1-7, F13A1 и EPB42. Для расширения таксономического состава TGM губок к последовательностям *A. queenslandica* и *H. dujardinii*, имеющимся в ортогруппе, были добавлены TGM, найденные при помощи HMMER v.3.4 [46] в геномных и транскриптомных данных губок *Sycon ciliatum*, *Ephydatia muelleri*,

и *Lubomirskia* spp. Также к набору добавлены TGM губок *Geodia barretti* и *Opsacas minuta*, найденные в базе данных NCBI nr при помощи программы blastp из пакета BLAST+ v.2.15. Все собранные последовательности выравнены программой MAFFT v. 7.475 [47] с использованием алгоритма L-INS-i. Последовательности из *S. ciliatum*, *E. muelleri*, *Lubomirskia* spp., у которых обнаружена архитектура со сдвоенным доменом TGM, были разделены на две части (N и C) для филогенетического анализа. Перед построением дерева из выравнивания при помощи программы trimAl v.1.2 были удалены участки, содержащие >70% пробелов [48]. Реконструкция филогенетического дерева выполнена методом максимального правдоподобия при помощи пакета IQ-TREE v.1.6.12 [49]: эволюционная модель для реконструкции (LG+R7) выбрана автоматически с помощью ModelFinder [50], поддержка узлов дерева оценена с использованием метода сверхбыстрого бутстрэпа UFBoot [51] с 1000 реплик. Построенное дерево визуализировано в программе MEGA v.7.0.21 [52].

**SDS-ПААГ-электрофорез и хромато-масс-спектрометрический анализ.** Аликвоты осветленных гомогенатов, содержащих 80 мкг белка, смешивали с буфером для нанесения образца, смесь нагревали на водяной бане при 95°C в течение 4 мин для денатурации белков. Денатурированные образцы белка подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле с SDS (SDS-ПААГ-электрофорез) при 160 В. Полоску геля, соответствующую подвижности TGM *H. dujardinii* с молекулярной массой в диапазоне 70 и 85 кДа, вырезали из SDS-геля, окрашенного Кумасси R250, и проводили хромато-масс-спектрометрический анализ, как описано ранее [39].

**Поиск бактериальных TGM.** Поиск белков с доменами TGM PF01841 (IPR002931) и PF09017 (IPR015107) проводили в транскриптомной базе *H. dujardinii* (NCBI, PRJNA594150) с помощью программы HMMER v.3.4 [46].

**Статистический анализ.** Результаты микрокопии анализировали при помощи встроенных функций языка R v.3.4 и визуализировали

с использованием пакета R ggplot2 v.3.4.4 [53]. По полученным гистограммам вычисляли медианные значения уровней интенсивности флуоресценции каждого образца. Показатели площади агрегатов использовали в исходном виде. Каждую группу образцов попарно сравнивали с контрольной с помощью критерия Манна-Уитни. Использовали стандартный уровень значимости  $p < 0.05$ .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гены транслугтаминаз губки *H. dujardinii* образуют кластер

На основе транскриптомных сборок губки *H. dujardinii*, описанных нами ранее (NCBI: PRJNA594150), идентифицированы шесть транскриптов TGM, которые мы именуем далее TGM x1–TGM x6. Аминокислотные последовательности TGM *H. dujardinii* имеют низкое сходство с белками человека (табл. 1). Аминокислотная последовательность TGM x6 в наибольшей степени отличалась от TGM x1–x5. На филогенетическом дереве TGM животных большинство последовательностей TGM губок образуют единую группу с умеренной поддержкой (61% бутстрэпа), которая включает все TGM представителей Demospongiae, а также TGM известковой губки *S. ciliatum* и стеклянной губки *O. minuta* (рис. 1). Два дополнительных представителя семейства TGM из *O. minuta* кластеризуются отдельно от основной группы TGM губок, ближе к корню дерева. Внутри основной группы TGM из *H. dujardinii* расходятся на две ветви, где TGM x1–TGM x5 образуют единую кладу, указывающую на серию относительно недавних дупликаций, сформировавших эту группу паралогов, а TGM x6 соответствует более древней дупликации, предположительно предшествующей дивергенции Demospongiae и стеклянных губок (рис. 1). Анализ выравнивания TGM также показал, что несколько видов губок (*S. ciliatum* и представителей Spongillida) содержат белки, состоящие из двух мономеров TGM, при этом обе части таких белков являются древними паралогами (N-half и C-half на рис. 1). Эти белки появились в ре-

Таблица 1. Транслугтаминазы *Halisarca dujardinii*

| Транслугтаминаза  |                               | Лучший белковый результат BLAST у человека |                               |                 |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Транскрипт (мРНК) | Регистрационный номер GenBank | Транслугтаминаза                           | Регистрационный номер GenBank | Идентичность, % |
| TGM x1            | PP198099                      | TGM4                                       | ACF75748.1                    | 33.23           |
| TGM x2            | PP198100                      | TGM1                                       | AAA61156.1                    | 27.57           |
| TGM x3            | PP198101                      | TGM1                                       | AAA61156.1                    | 36.64           |
| TGM x4            | PP198102                      | TGM1                                       | AAA61156.1                    | 33.73           |
| TGM x5            | PP198103                      | TGM1                                       | AAA61156.1                    | 35.67           |
| TGM x6            | PP198104                      | TGM1                                       | AAA61156.1                    | 29.88           |

## СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ КЛАСТЕРА ТРАНСГЛУТАМИНАЗ

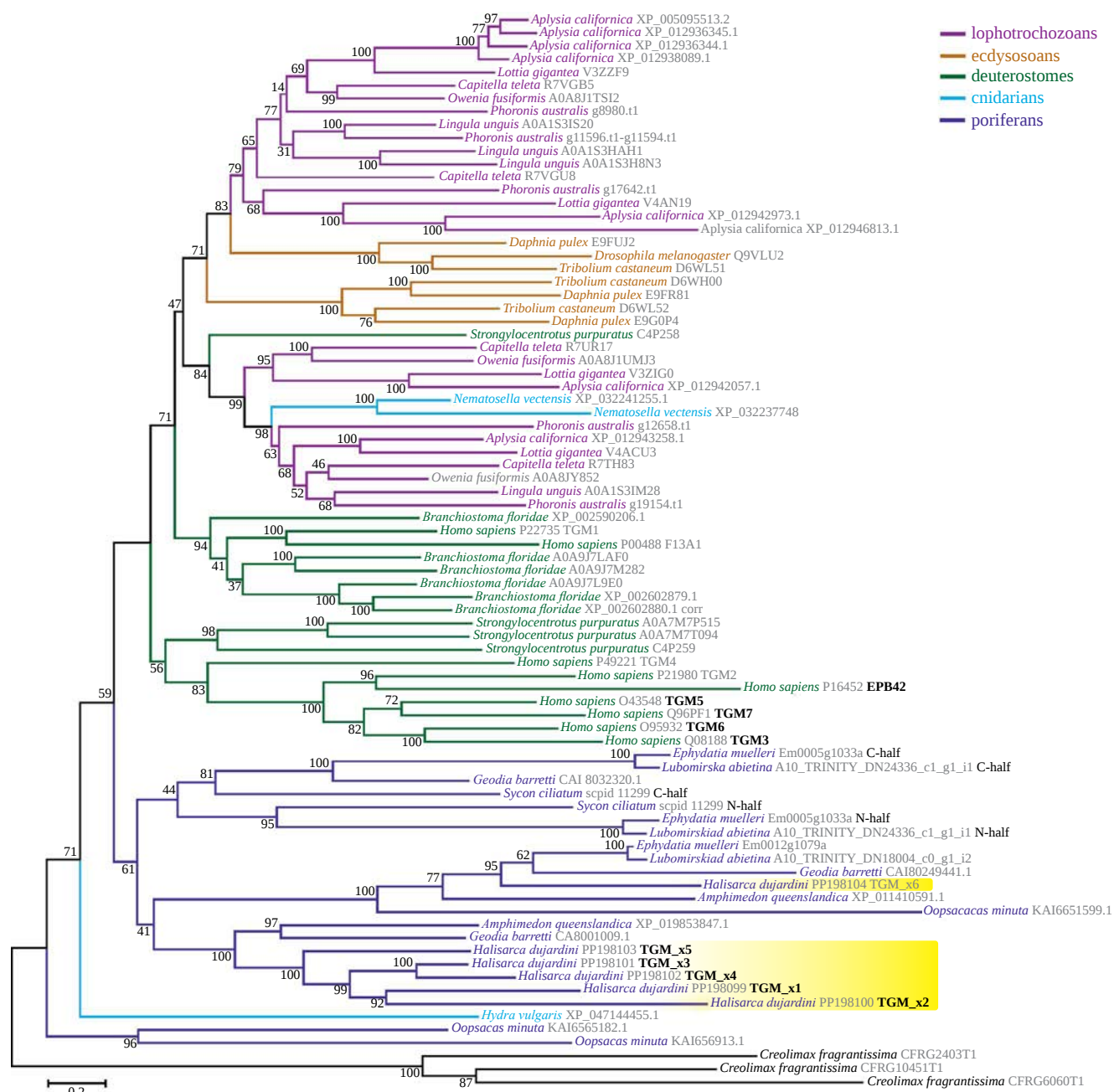


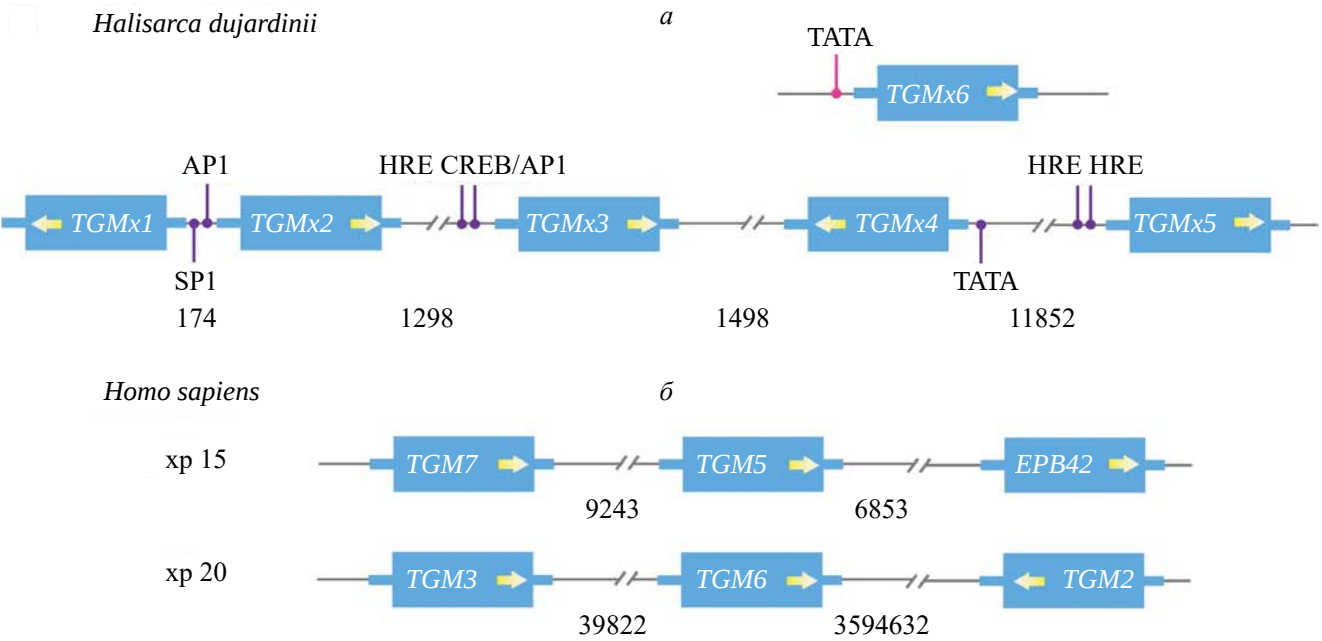
Рис. 1. Филогенетическое дерево TGM животных. Цифры на узлах дерева соответствуют оценкам поддержки узла методом сверхбыстрого бутстрэпа UFBoot с 1000 реплик.

зультате древней дупликации и последующего слияния дублированных генов *TGM*.

С помощью программы BLAST в геномных последовательностях *H. dujardini* обнаружены шесть генов, каждый из которых соответствует найденным транскриптам. Пять из шести генов (*TGM x1–TGM x5*) организованы в генный кластер на одной хромосоме (рис. 2a). Ген *TGM x6*, относящийся к другой ветви на филогенетиче-

ском древе, в этот кластер не входит и лежит на другом скаффолде.

Ни один из генов кластера *TGM x1–TGM x5* не имеет ТАТА-содержащего промотора, но 5'-последовательности этих генов несут некоторые *cis*-регуляторные элементы, связанные с ответом на гипоксию (табл. 2, рис. 2a). Эти регуляторные элементы отсутствуют в гене *TGM x6*, но он содержит ТАТА-бокс.



**Рис. 2.** Гены *TGM* губки *H. dujardini* (a) и человека (б). Цифрами указаны расстояния между генами в парах нуклеотидов. В 5'-области генов губки *H. dujardini* показаны регуляторные последовательности: TATA-бокс; HRE – элемент, отвечающий на гипоксию; AP1, SP1, CREB/AP1 – сайты связывания с соответствующими транскрипционными факторами.

Бактериальные трансглутаминазы

В транскриптомных библиотеках *H. dujardini* (SRX7284265, SRX7284266, SRX7284271, SRX7284272, SRX7284273, SRX7284274), включающих также бактериальные симбионты, бактериальные *TGM* не обнаружены.

Особенности экспрессии генов *TGM* губки *H. dujardini*

Чтобы оценить вклад генов *TGM* в процессы диссоциации и реагрегации клеток губки *H. dujardini*, мы сравнили уровни их экспрессии в ткани тела губки, диссоциированных клетках и клеточных агрегатах спустя 24 ч после диссоциации губок. Транскриптомное профилирование методом РНК-Seq проводили на губках, собранных в разные сезоны, то есть в разные периоды их жизненного цикла. Выявлены различия в экспрессии разных генов *TGM* (рис. 3) в течение годового цикла губки. Ген *TGM x3* экспрессировался на высоком уровне на протяжении всего года, а *TGM x5* – на низкой. Экспрессия гена *TGM x3* была выше, а *TGM x4* ниже в летний период, который характеризуется высокой температурой и низким содержанием кислорода в воде. Наиболее стабильными изменения экспрессии в процессе реагрегации были у двух генов – *TGM x1* и *TGM x5*, экспрессия этих генов в агрегатах снижалась.

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности 5'-области, участвующие в регуляции экспрессии генов *TGM*

| Регуляторный элемент | Нуклеотидная последовательность | Источник |
|----------------------|---------------------------------|----------|
| AP1                  | 5'-TGAGGTCT-3'                  | [54]     |
|                      | 5'-TGACTCT-3'                   |          |
|                      | 5'-TGACATCA-3'                  |          |
| AP2                  | 5'-TACCCCCCCCCACT-3'            | [55]     |
| CREB/AP1             | 5'-TGATGTCA-3'                  | [26]     |
| HRE                  | 5'-RCGTG-3'                     | [56]     |
| NF1                  | 5'-GCCAA-3'                     | [55]     |
| SP1                  | 5'-GGGCGG-3'                    | [57]     |

Особенности трансглутаминаз *H. dujardini*

Для предсказания возможной ферментативной активности *TGM* проведено выравнивание аннотированных нами аминокислотных последовательностей каталитических сайтов, ответственных за переамидирование в субстрате (рис. 4). Каталитические сайты отмечены на основе опубликованных данных [58].

*TGM* губки *H. dujardini* имеют низкое сходство как между собой, так и с *TGM* человека (табл. 1). Однако пять *TGM H. dujardini* сохраняют активные остатки цистеина, гистидина и аспарагиновой кислоты, необходимые для каталитической активности (рис. 4). Отсутствие ферментативной активности как у *TGM x2*, так

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ КЛАСТЕРА ТРАНСГЛУТАМИНАЗ

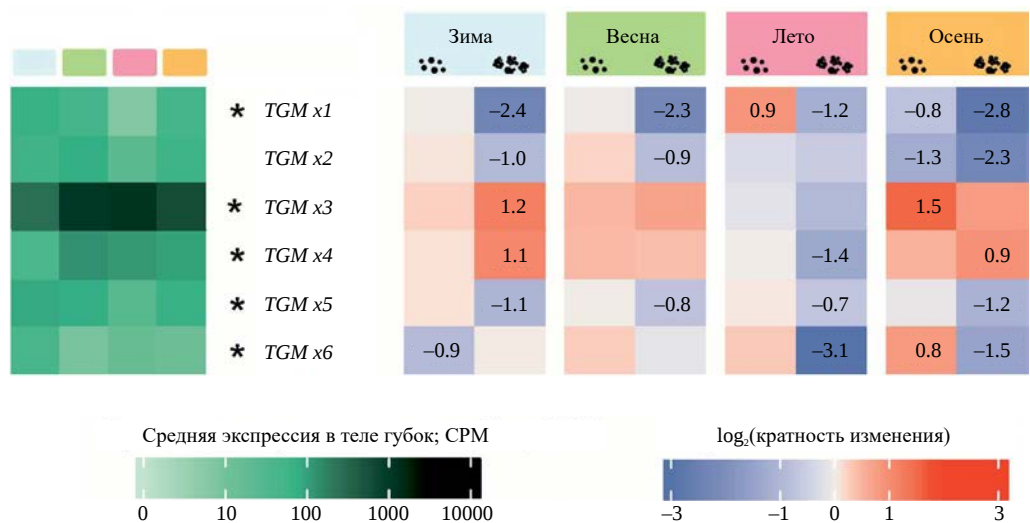


Рис. 3. Экспрессия генов TGM при диссоциации/реагрегации губки *H. dujardinii* в разные периоды годового цикла. Слева показан уровень экспрессии генов в ткани тела губки в разные периоды годового цикла. Голубым, салатовым, розовым и оранжевым цветом обозначены зима, весна, лето и осень соответственно. \*Статистически значимые различия в экспрессии генов TGM в ткани тела губки в разные сезоны. Справа показано изменение экспрессии в диссоциированных клетках и клеточных агрегатах по сравнению с интактной губкой. Большими и маленькими точками обозначены диссоциированные клетки и агрегаты. Справа на тепловой карте приведены только статистически значимые различия ( $FDR < 0.001$ , см. Экспериментальную часть).

и у EPB42 человека, по-видимому, обусловлено заменой Cys376Ser.

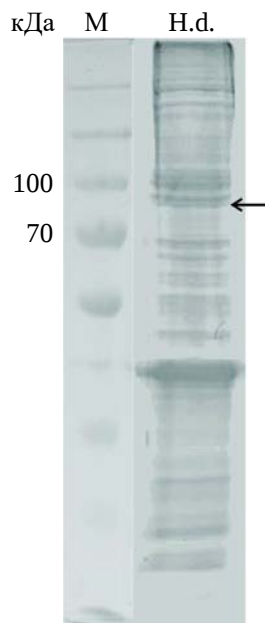
Для идентификации белковых продуктов лизаты клеток губки *H. dujardinii* фракционировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и анализировали зону геля, соответствующую предсказанному молекулярным массам TGM. С помощью масс-спектрометрии обнаружены два белка – TGM x3 и TGM x5 (рис. 5, табл. 3). Оба белка экспрессируются генами, входящими в генный кластер.

Участие трансклутаминаз в восстановлении многоклеточной структуры губки

Реагрегацию клеток губок изучали в присутствии разных концентраций цистамина [33] в инкубационной среде. Оказалось, что через 2 ч после механической диссоциации губки в суспензии клеток, инкубированной в присутствии 1–25 мМ цистамина, число неагрегированных клеток было меньше, а размер агрегатов крупнее, чем в контроле без добавки цистамина (рис. 6).

|               |          |        | Cys376           |  | His435                 |  | Asp458        |
|---------------|----------|--------|------------------|--|------------------------|--|---------------|
|               |          |        | ↓                |  | ↓                      |  | ↓             |
| <i>H. sap</i> | P22735   | TGM1   | YSVPYGCQWVFAGVTT |  | LNHDSVWNEHVWNCWMKRPDL  |  | -FDGWQVVDATPQ |
| <i>H. sap</i> | P21980   | TGM2   | QRVKYGCQWVFAAVAC |  | -KSEMIWNFHCWVESWMTRPDL |  | -YEGWQALDPTPQ |
| <i>H. sap</i> | Q08188   | TGM3   | SPVRYGCQWVFAGTLN |  | -GSDSVWNHNVWNEGWFVRSDL |  | -YGGWQVLDATPQ |
| <i>H. sap</i> | P49221   | TGM4   | QAVCFGQCWVFAGILT |  | MTHDSVWNFHVWTDAMWKRPDL |  | -YDGWQAVDATPQ |
| <i>H. sap</i> | O43548   | TGM5   | QPVRYGCQWVFAAVMC |  | KKKDTIWNFEVWNECWMARKDL |  | -YGGWQVLDATPQ |
| <i>H. sap</i> | O95932   | TGM6   | KPVKYGCQWVFAGVLC |  | LTEDSMWNFHVWNESWFARQDL |  | -YNGWQVLDATPQ |
| <i>H. sap</i> | Q96PF1   | TGM7   | QPVKYGCQWVFASVMC |  | QKRDKIWNHNVWNECWMTKDL  |  | -YNGWQVLDPTPQ |
| <i>H. sap</i> | P00488   | F13A   | NPVRYGCQWVFAGVFN |  | LTKDSVWNHVCWNEAWMTRPDL |  | -FGGWQAVDSTPQ |
| <i>H. sap</i> | P16452   | EPB42  | RPVYDGOAWVLAAC   |  | GQRGRIWIEQTSTECWMTRPAL |  | -YDGWQILHPSAP |
| <i>H. duj</i> | PP198099 | TGM-x1 | EPVKFAQCWVFGGTLT |  | LCSDTTWNHNVWVEGWMERPDL |  | VYGGWQALDSTPQ |
| <i>H. duj</i> | PP198100 | TGM-x2 | KPVKWAQSWVFAGTLT |  | LSGGHLWNHNVWVEGWMERPDL |  | VYGGWQALDSTPQ |
| <i>H. duj</i> | PP198101 | TGM-x3 | KSMYYAQCWVFGGTLT |  | LTNDSIWNHNVWVEGWMERPDL |  | VYGGWQALDSTPQ |
| <i>H. duj</i> | PP198102 | TGM-x4 | KAVKYAQCWVFGGTLT |  | VTADTYWNHNVWVEGWMERPDL |  | VYGGWQALDSTPQ |
| <i>H. duj</i> | PP198103 | TGM-x5 | KVVKYAQCWVFGGTLT |  | MSAGSIWNHNVWVEGWMERPDL |  | VYGGWQALDSTPQ |
| <i>H. duj</i> | PP198104 | TGM-x6 | FPVKTGCEVFSAVAV  |  | LCKDSVWVHNVWVEAWMKREDI |  | -FDGWQVIDAIP  |

Рис. 4. Вывравнивание аминокислотных последовательностей каталитических сайтов TGM *H. dujardinii* и человека. Стрелками и рамками выделены каталитические остатки цистеина 376 (Cys376), гистидина 435 (His435) и аспарагиновой кислоты 458 (Asp458), необходимые для каталитической активности. Голубым показаны замены ключевых аминокислот. Нумерация приведена для TGM1 *H. sapiens*.



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ белков в 10%-ном SDS-ПААГ, окрашивание Coomassie R250. М – маркер молекулярной массы; H. d. – осветленный гомогенат клеточной суспензии *H. dujardinii*. Стрелкой показана зона, использованная для идентификации TGM *H. dujardinii* методом масс-спектрометрии.

Через 24 ч после диссоциации в контрольных и опытных образцах клеточной суспензии образовались округлые клеточные агрегаты. Размер агрегатов в присутствии цистамина (ингибитора TGM) в концентрации 1 мМ был таким же, как в контроле, а при 5 и 25 мМ был в среднем больше, чем в контроле (рис. 7).

*Динамика ROS при ингибировании трансклутаминаз в процессе реагрегации клеток губки*

Анализ ROS в клетках суспензии, полученной после диссоциации губки, выявил клетки с высоким и низким содержанием ROS. Однако не обнаружено связи ROS с определенными морфологическими параметрами клеток (рис. 8).

Через 24 ч после диссоциации губки наблюдается повышение содержания ROS в клетках агрегатов, образовавшихся в присутствии цистамина (рис. 9).

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

TGM млекопитающих изучают в связи с их возможным участием в патогенезе различных заболеваний. Эти ферменты также служат мишенями в терапии опухолей [30, 59], нейродегенеративных заболеваний [60], катаракты [34], хронических заболеваний почек [61]. Информация о функционировании TGM у базальных животных отсутствует.

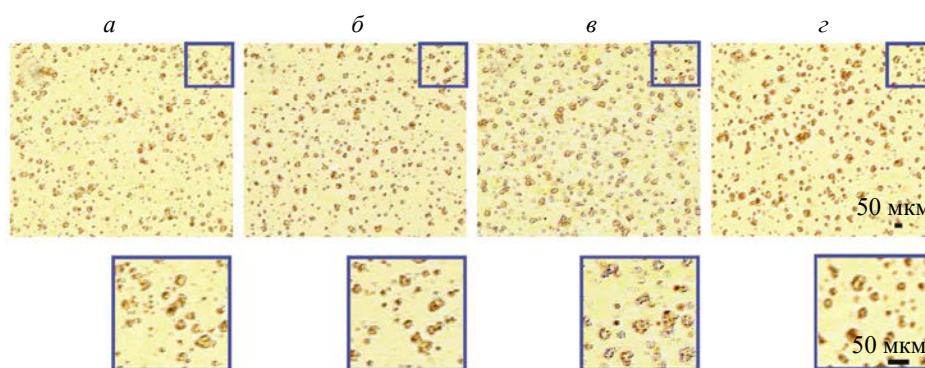
У морской губки *H. dujardinii* нами обнаружены шесть изоформ TGM, одна из которых, предположительно, не обладает ферментативной активностью. Пять из шести генов *TGM* образуют кластер (рис. 2), что, по-видимому, распространено достаточно широко. Кластерная организация генов *TGM* наблюдается и у млекопитающих [61]. Об этом также свидетельствуют

**Таблица 3.** Данные масс-спектрометрического анализа трансклутаминаз *H. dujardinii*

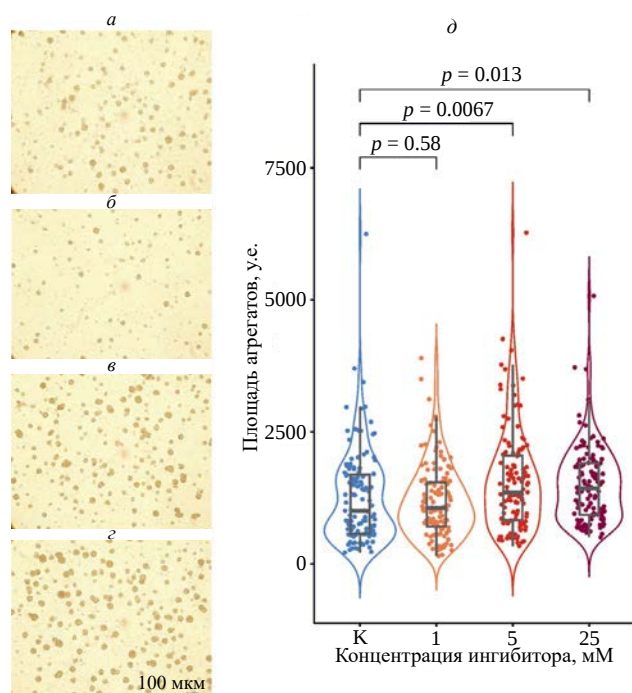
| Фермент | NCBI ID  | –10 lgP <sup>a</sup> | Покры-<br>тие, % | Уникальный пептид                                                                             | Посттрансляционная<br>модификация | Mr, Да  |
|---------|----------|----------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| TGM x3  | PP198101 | 258.93               | 9.20             | ADIAVGPK<br>AGEASTVTASFR<br>FGLDSELR<br>GVVEVPIR<br>IWAGSYK<br>LDSELR<br>LTPEEYVGK<br>SPVHVSR |                                   | 68485.4 |
| TGM x5  | PP198103 | 264.39               | 8.30             | AAAVAEAR<br>GESPAFK<br>HPEGSLEER<br>IITC(+57.02)SVK<br>SIDFYFDEK<br>THGEVVR<br>VPLGSIATVK     | Карбамидометилиро-<br>вание       | 77619.2 |

<sup>a</sup> Показатель PEAKS DB score, отражающий статистическую значимость совпадения спектра пептида с каким-либо пептидом из базы (форма записи *p*-значения, определяемого программой PEAKS как вероятность того, что ложная идентификация при поиске в базе данных даст такой же или лучший результат соответствия). Значения –10 lgP > 30 (эквивалентно *p*-значениям <0.001) представляют собой совпадения высокого качества.

## СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ КЛАСТЕРА ТРАНСГЛУТАМИНАЗ

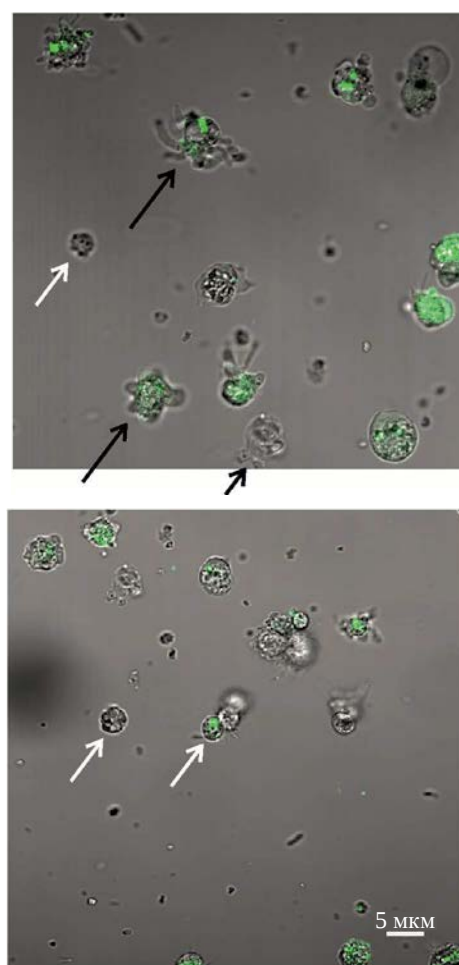


**Рис. 6.** Клеточная суспензия через 2 ч после диссоциации губки. *a* – Контроль. *б–г* – Суспензия в присутствии 1, 5, 25 мМ цистамина. Шкала – 50 мкм.



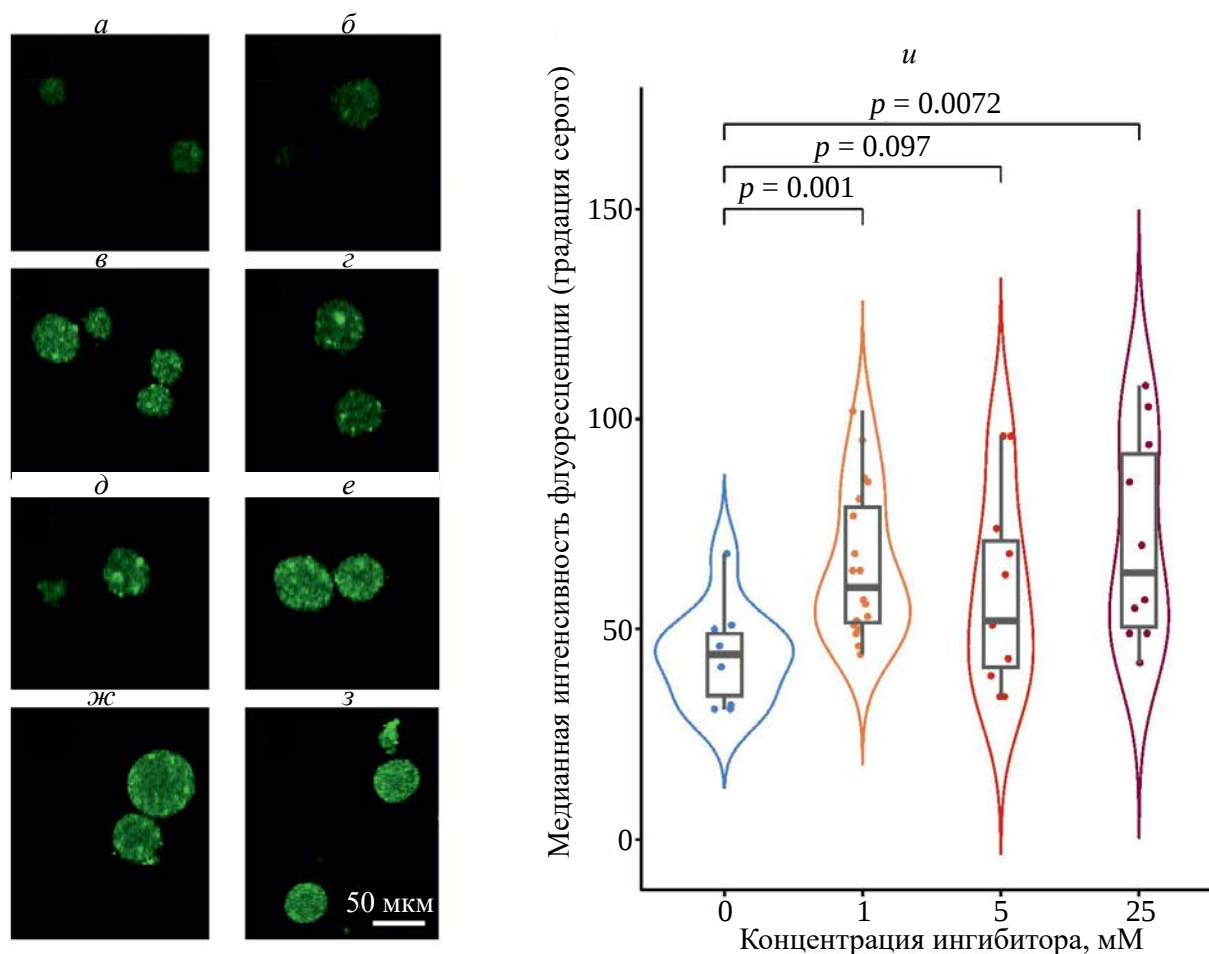
**Рис. 7.** Агрегаты клеток через 24 ч после диссоциации губки, образовавшиеся в отсутствие (*a*) и в присутствии цистамина в концентрации 1 мМ (*б*); 5 мМ (*в*) и 25 мМ (*г*). Шкала – 100 мкм. *д* – Сравнительный анализ площади агрегатов.

обнаруженные нами у нескольких губок слитые белки TGM, предположительно возникшие путем слияния соседних генов в древнем кластере (рис. 1). Изоформы TGM могут экспрессироваться в разных типах клеток или при разном физиологическом состоянии губок. Об этом говорит разнообразие регуляторных последовательностей этих генов и их дифференциальная экспрессия в разные периоды годового жизненного цикла губки. Так, в летний период, отличающийся повышенным содержанием кислорода и большим количеством фотосинтезирующих бактерий в воде, наблюдается увеличение экспрессии *TGM x3*, но снижение *TGM x1*, *x2* и *x6*. Низкая гомология изоформ TGM *H. dujardinii*



**Рис. 8.** Конфокальная микроскопия суспензии клеток губки *H. dujardinii*. Зеленым цветом показана флуоресценция клеток после добавления в инкубационную среду  $H_2DCFDA$ . Белыми стрелками показаны мелкие округлые клетки, черными – крупные с выростами.

позволяет предположить, что они могут выполнять различные функции. Несмотря на низкую гомологию с ферментами человека, все TGM *H. dujardinii*, кроме TGM *x6*, сохранили активные каталитические центры. TGM *x6* с заменой Cys376Ser может выполнять важные функции



**Рис. 9.** Флуоресценция клеточных агрегатов после добавления в инкубационную среду  $H_2DCFDA$ . а,б – Контроль. В присутствии цистамина: в,г – 1 мМ; д,е – 5 мМ; ж,з – 25 мМ. и – Сравнительный анализ интенсивности флуоресценции.

в клетке, подобно EPB42 человека, мутация которой приводит к наследственному сфероцитозу [62]. Таким образом, TGM *H. dujardinii* произошли уже после обособления губок от общего ствола с животными и являются продуктом дупликаций, специфичных для губок.

Процесс механической диссоциации губки сопровождается нарушением питания клеток из-за разрушения водоносной системы и оксигенации клеток, что приводит к метаболическому стрессу. Ранее мы показали, что диссоциация тела губки на отдельные клетки сопровождается снижением экспрессии генов, связанных с биосинтезом гема, обменом железа и реакцией на гипоксию [35]. В процессе образования агрегатов наблюдается повышение экспрессии антиапоптотического фактора BCL2 [35, 36]. Известно, что TGM вовлечены в формирование устойчивости к метаболическому стрессу [63], а также участвуют в регуляции апоптоза как в качестве антиапоптотического, так и проапоптотического фактора в зависимости от физиологического состояния клеток [5]. Уровень экспрессии

TGM контролируется ROS и связан с активностью BCL2 [30]. Добавление ингибитора TGM в клеточную суспензию может запускать разнонаправленные процессы в зависимости от типа клеток. млекопитающих Показано, что ингибиторы TGM цистамин и цистеамин могут индуцировать гибель клеток млекопитающих определенного типа [64]. Ингибирование TGM ускорило агрегацию клеток губки на ранней стадии (2 ч после диссоциации), увеличивало средний размер клеточных агрегатов (к 24 ч) и приводило к увеличению продукции ROS в агрегатах. Известно, что TGM, находящиеся на клеточной поверхности, участвуют в регуляции адгезии [65, 66]. Наблюдаемое ускорение агрегации клеток губки в присутствии цистамина (рис. 6) может быть обусловлено изменением скорости клеточной адгезии. Подавление активности TGM может приводить также к увеличению экспрессии BCL2 в клетках, находящихся в состоянии метаболического стресса [30].

Цистамин действует как окислительно-восстановительный модификатор, способный ре-

гулировать ROS внутри клетки [67]. Увеличение содержания ROS в агрегатах в присутствии цистамина как в низкой (1 мкМ), так и в высокой (5–25 мкМ) концентрации обусловлено, возможно, ингибированием разных активностей TGM. В одном случае цистамин препятствует сшивающей активности TGM, действуя в качестве альтернативного субстрата [68], в другом ингибирует активность TGM, изменяя дисульфидные связи активного остатка Cys376 [69]. Возможно также переключение активностей между этими двумя механизмами. TGM участвует в регуляции клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток посредством трансамидирования ядерных белков [6]. Большое количество данных указывает на участие моноаминов во внутриклеточной регуляции посредством таких посттрансляционных модификаций, как серотонилирование [70, 71]. Можно предположить, что подобные механизмы участвуют и в регуляции реагрегации клеток губки.

Еще одной причиной повышения ROS при воздействии цистамина может быть уменьшение уровня глутатиона — антиоксиданта, играющего важную роль в поддержании окислительно-восстановительного статуса клеток. Известно, что в некоторых клеточных линиях млекопитающих цистамин снижает уровень внутриклеточного глутатиона, ингибируя ключевой фермент его синтеза — глутамилцистеин-синтазу, посредством реакции обмена между сульфгидрильными группами. Введение цистамина крысам вызывает истощение запасов глутатиона в клетках [64]. ROS является детектором состояния клетки, участвующим в регуляции многих процессов, в том числе, в ингибировании TGM. Изучение изменений уровня глутатиона в клетках губок после обработки цистамином будет продолжено.

Губки являются симбиотическими организмами, они существуют только в симбиозе с бактериями [72]. Метаболические пути губок и микроорганизмов взаимосвязаны. Однако мы не обнаружили бактериальные TGM в образцах *H. dujardinii*. Таким образом, участие бактериальных TGM в процессе реагрегации клеток *H. dujardinii* представляется маловероятным.

Проведенное исследование губки *H. dujardinii* показало, что это эволюционно древнее животное имеет сложно устроенный кластер генов TGM, обеспечивающий дифференциальную экспрессию изоформ в жизненном цикле. Несмотря на низкий уровень гомологии, TGM губок сохраняют консервативные каталитические центры и, вероятно, функции сходные с ферментами млекопитающих. Исследование биохимических путей базального многоклеточного животного важно для понимания эволю-

ции молекулярных механизмов у позвоночных. Изучение морских губок имеет и практическое значение, поскольку они являются важным источником биологически активных веществ, в том числе, обладающих противоопухолевой активностью [73]. TGM морских губок могут в перспективе использоваться для модификации и сшивания белков в фармацевтической и пищевой промышленности.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала туристическому центру “Поллярный Круг” (Россия).

Исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ИБР РАН).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-74-00111, <https://rscf.ru/project/22-74-00111/>).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shibata T., Kawabata S. (2018) Pluripotency and a secretion mechanism of *Drosophila* transglutaminase. *J. Biochem.* **163**, 165–176.
2. Lerner A., Matthias T. (2020) Processed food additive microbial transglutaminase and its cross-linked gliadin complexes are potential public health concerns in celiac disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1127.
3. Della Mea M., Caparrós-Ruiz D., Claparols I., Serafini-Fracassini D., Rigau J. (2004) AtPng1p. The first plant transglutaminase. *Plant Physiol.* **135**, 2046–2054.
4. Eckert R.L., Kaartinen M.T., Nurminskaya M., Belkin A.M., Colak G., Johnson G.V., Mehta K. (2014) Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417.
5. Nurminskaya M.V., Belkin A.M. (2012) Cellular functions of tissue transglutaminase. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **294**, 1–97.
6. Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N.R., Obukhova A., Khabarova M.Y., Yakusheff A., Adameyko I., Gribble K.E., Voronezhskaya E.E. (2019) Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 3888–3899.
7. Zanetti L., Ristatore F., Bertoni A., Cariello L. (2004) Characterization of sea urchin transglutami-

- nase, a protein regulated by guanine/adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **279**, 49289–49297.
8. Aaron L., Torsten M. (2019) Microbial transglutaminase: a new potential player in celiac disease. *Clin. Immunol.* **199**, 37–43.
  9. Choi Y.-S., Jeong T.-J., Kim H.-W., Hwang K.-E., Sung J.-M., Seo D.-H., Kim Y.-B., Kim C.-J. (2017) Combined effects of sea mustard and transglutaminase on the quality characteristics of reduced-salt frankfurters: effect of transglutaminase and sea mustard on quality of sausages. *J. Food Proc. Preservation.* **41**, e12945.
  10. Park Y.S., Choi Y.S., Hwang K.E., Kim T.K., Lee C.W., Shin D.M., Han S.G. (2017) Physico-chemical properties of meat batter added with edible silkworm pupae (*Bombyx mori*) and transglutaminase. *Korean J. Food Sci. Anim. Resource.* **37**, 351–359.
  11. Sun C.K., Ke C.J., Lin Y.W., Lin F.H., Tsai T.H., Sun J.S. (2021) Transglutaminase cross-linked gelatin-alginate-antibacterial hydrogel as the drug delivery-coatings for implant-related infections. *Polymers.* **13**, 414.
  12. Porta R., Mariniello L., Di Pierro P., Sorrentino A., Giosafatto C.V. (2011) Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan-based edible films: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 223–238.
  13. Iismaa S.E., Mearns B.M., Lorand L., Graham R.M. (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.* **89**, 991–1023.
  14. Lorand L., Graham R.M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–156.
  15. Baumgartner W., Golenhofen N., Weth A., Hiiragi T., Saint R., Griffin M., Drenckhahn D. (2004) Role of transglutaminase 1 in stabilisation of intercellular junctions of the vascular endothelium. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 17–25.
  16. Martinet N., Bonnard L., Regnault V., Picard E., Burke L., Siat J., Grosdidier G., Martinet Y., Vignaud J.M. (2003) *In vivo* transglutaminase type 1 expression in normal lung, preinvasive bronchial lesions, and lung cancer. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **28**, 428–435.
  17. Fesus L., Piacentini M. (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 534–539.
  18. Dubbink H.J., Cleutjens K.B., van der Korput H.A., Trapman J., Romijn J.C. (1999) An Sp1 binding site is essential for basal activity of the human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4) promoter. *Gene.* **240**, 261–267.
  19. Cassidy A.J., van Steensel M.A., Steijlen P.M., van Geel M., van der Velden J., Morley S.M., Terrinoni A., Melino G., Candi E., McLean W.H. (2005) A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 909–917.
  20. Board P.G., Webb G.C., McKee J., Ichinose A. (1988) Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24–p25. *Cytogenet. Cell Genet.* **48**, 25–27.
  21. Yang L., Shu H., Zhou M., Gong Y. (2022) Literature review on genotype–phenotype correlation in patients with hereditary spherocytosis. *Clin. Genet.* **102**, 474–482.
  22. Wang R., Liang Z., Hal M., Söderhall K. (2001) A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localisation and cDNA cloning. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 623–637.
  23. Cariello L., Ristatore F., Zanetti L. (1997) A new transglutaminase-like from the ascidian *Ciona intestinalis*. *FEBS Lett.* **408**, 171–176.
  24. Mádi A., Punyiczki M., di Rao M., Piacentini M., Fésüs L. (1998) Biochemical characterization and localization of transglutaminase in wild-type and cell-death mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **253**, 583–590.
  25. Draper G.W., Shoemark D.K., Adams J.C. (2019) Modelling the early evolution of extracellular matrix from modern ctenophores and sponges. *Essays Biochem.* **63**, 389–405.
  26. Li L., Watson C.J., Dubourd M., Bruton A., Xu M., Cooke G., Baugh J.A. (2016) HIF-1-dependent TGM1 expression is associated with maintenance of airway epithelial junction proteins. *Lung.* **194**, 829–838.
  27. Liu T., Tee A.E., Porro A., Smith S.A., Dwarde T., Liu P.Y., Iraci N., Sekyere E., Haber M., Norris M.D., Diolaiti D., Della Valle G., Perini G., Marshall G.M. (2007) Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 18682–18687.
  28. Chhabra A., Verma A., Mehta K. (2009) Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context. *Anticancer Res.* **29**(6), 1909–1919.
  29. Lee M.Y., Wu M.F., Cherng S.H., Chiu L.Y., Yang T.Y., Sheu G.T. (2018) Tissue transglutaminase 2 expression is epigenetically regulated in human lung cancer cells and prevents reactive oxygen species-induced apoptosis. *Cancer Manag. Res.* **10**, 2835–2848.
  30. Su X., He X., Ben Q., Wang W., Song H., Ye Q., Zang Y., Li W., Chen P., Yao W., Yuan Y. (2017) Effect of p53 on pancreatic cancer-glucose tolerance abnormalities by regulating transglutaminase 2 in resistance to glucose metabolic stress. *Oncotarget.* **8**, 74299–74311.
  31. Kim Y., Eom S., Kim K., Lee Y.S., Choe J., Hahn J.H., Lee H., Kim Y.M., Ha K.S., Ro J.Y., Jeoung D. (2010) Transglutaminase II interacts with rac1, regulates production of reactive oxygen species, expression of snail, secretion of Th2 cytokines and mediates *in vitro* and *in vivo* allergic inflammation. *Mol. Immunol.* **47**, 1010–1022.
  32. Junkunlo K., Söderhäll K., Söderhäll I., Noonin C. (2016) Reactive oxygen species affect transglutaminase activity and regulate hematopoiesis in a Crustacean. *J. Biol. Chem.* **291**, 17593–17601.

33. Jeon J.H., Lee H.J., Jang G.Y., Kim C.W., Shim D.M., Cho S.Y., Yeo E.J., Park S.C., Kim I.G. (2004) Different inhibition characteristics of intracellular transglutaminase activity by cystamine and cysteamine. *Exp. Mol. Med.* **36**, 576–581.
34. Lee S.M., Jeong E.M., Jeong J., Shin D.M., Lee H.J., Kim H.J., Lim J., Lee J.H., Cho S.Y., Kim M.K., Wee W.R., Lee J.H., Kim I.G. (2012) Cysteamine prevents the development of lens opacity in a rat model of selenite-induced cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 1452.
35. Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Georgiev A.A., Gornostaev N.G., Kosevich I.A., Mikhailov V.S., Gazizova G.R., Shagimardanov E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2020) Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity. *PLoS One*. **15**, e0228722.
36. Adameyko K.I., Burakov A.V., Finoshin A.D., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Kozlova O.S., Gornostaev N.G., Cherkasov A.V., Erokhov P.A., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Bonchuk A.N., Zhegalova I.V., Georgiev A.A., Mikhailov V.S., Gogoleva N.E., Gazizova G.R., Shagimardanov E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2021) Conservative and atypical ferritins of sponges. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8635.
37. Ereskovsky A. (2000) Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrustans* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea. *Biol. Bull.* **198**, 77–87.
38. Кравчук О.И., Бураков А.В., Горностаев Н.Г., Михайлов К.В., Адамейко К.И., Финошин А.Д., Георгиев А.А., Михайлов В.С., Ерюкова Ю.Э., Рубиновский Г.А., Заиц Д.В., Газизова Г.Р., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. (2021) Деацетилазы гистонов в процессе агрегации клеток губки *Halisarca dujardini*. *Онтогенез*. **52**, 367–383.
39. Кравчук О.И., Финошин А.Д., Михайлов К.В., Зиганшин Р.Х., Адамейко К.И., Горностаев Н.Г., Жураковская А.И., Михайлов В.С., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. (2023) Характеристика дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты холодноводной губки *Halisarca dujardini*. *Молекуляр. биология*. **57**, 1085–1097.
40. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **8**, 1494–1512.
41. Altschul S. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402.
42. Zimin A.V., Marçais G., Puiu D., Roberts M., Salzberg S.L., Yorke J.A. (2013) The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*. **29**, 2669–2677.
43. Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. (2014) Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. **9**, e112963.
44. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. (2010) edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. **26**, 139–140.
45. Emms D.M., Kelly S. (2019) OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol.* **20**, 238.
46. Eddy S.R. (2011) Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002195.
47. Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780.
48. Capella-Gutierrez S., Silla-Martinez J.M., Gabaldon T. (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. **25**, 1972–1973.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
53. Wickham H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2<sup>nd</sup> Ed. Switzerland: Springer, 260 p.
54. Лапиков И.А., Могиленко Д.А., Диде Э.Б., Игнатович И.А., Орлов С.В., Перевозчиков А.П. (2008) Ap1-подобные цис-элементы в 5'-регуляторной области гена аполипопротеина А-I человека. *Молекуляр. биология*. **42**, 295–305.
55. Zhao W., Chow L.T., Broker T.R. (1999) A distal element in the HPV-11 upstream regulatory region contributes to promoter repression in basal keratinocytes in squamous epithelium. *Virology*. **253**, 219–229.
56. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 5510–5514.
57. Dynan W.S., Tjian R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. **35**, 79–87.
58. Yee V.C., Pedersen L.C., Le Trong I., Bishop P.D., Stenkamp R.E., Teller D.C. (1994) Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood

- coagulation factor XIII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 7296–7300.
59. Budillon A., Carbone C., Di Gennaro E. (2013) Tissue transglutaminase: a new target to reverse cancer drug resistance. *Amino Acids*. **44**, 63–72.
  60. Min B., Chung K.C. (2018) New insight into transglutaminase 2 and link to neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* **51**, 5–13.
  61. Prat-Duran J., Pinilla E., Nørregaard R., Simonson U., Buus N.H. (2021) Transglutaminase 2 as a novel target in chronic kidney disease – methods, mechanisms and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Ther.* **222**, 107787.
  62. He B.J., Liao L., Deng Z.F., Tao Y.F., Xu Y.C., Lin F.Q. (2018) Molecular genetic mechanisms of hereditary spherocytosis: current perspectives. *Acta Haematol.* **139**, 60–66.
  63. Kamisawa T., Wood L.D., Itoi T., Takaori K. (2016) Pancreatic cancer. *Lancet*. **388**, 73–85.
  64. Cho S.Y., Lee J.H., Ju M.K., Jeong E.M., Kim H.J., Lim J., Lee S., Cho N.H., Park H.H., Choi K., Jeon J.H., Kim I.G. (2015) Cystamine induces AIF-mediated apoptosis through glutathione depletion. *Biochim. Biophys. Acta*. **1853**, 619–631.
  65. Akimov S.S., Belkin A.M. (2001) Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*. **98**, 1567–1576.
  66. Li M., Wang X., Chen X., Hong J., Du Y., Song D. (2024) GK921, a transglutaminase inhibitor, strengthens the antitumor effect of cisplatin on pancreatic cancer cells by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochim. Biophys. Acta*. **1870**, 166925.
  67. Ferreira D., Naquet P., Manautou J. (2015) Influence of vanin-1 and catalytic products in liver during normal and oxidative stress conditions. *Curr. Med. Chem.* **22**, 2407–2416.
  68. Jeitner T.M., Delikatny E.J., Ahlqvist J., Capper H., Cooper A.J. (2005) Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 961–970.
  69. Lorand L., Conrad S.M. (1984) Transglutaminases. *Mol. Cell Biochem.* **58**, 9–35.
  70. Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Dennis Willows A.O., Nezlin L.P. (2003) Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia). *Cell Tissue Res.* **311**, 259–266.
  71. Glebov K., Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Ivashkin E., Nezlin L.P., Ponimaskin E.G. (2014) Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis* (Mollusca). *BMC Dev. Biol.* **14**, 14.
  72. Vacelet J., Donadey C. (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301–314.
  73. Calcabrini C., Catanzaro E., Bishayee A., Turrini E., Fimognari C. (2017) Marine sponge natural products with anticancer potential: an updated review. *Mar. Drugs*. **15**, 310.

## Structure and Function of the Transglutaminase Cluster in the Basal Metazoan *Halisarca dujardinii* (Sponge)

A. D. Finoshin<sup>1</sup>, O. I. Kravchuk<sup>1</sup>, K. V. Mikhailov<sup>2, 3</sup>, R. H. Ziganshin<sup>4</sup>, K. I. Adameyko<sup>1</sup>, V. S. Mikhailov<sup>1</sup>, Yu. V. Lyupina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

<sup>3</sup>Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

<sup>4</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: alexcolton@yandex.ru

Transglutaminases are enzymes that carry out post-translational modifications of proteins and participate in the regulation of their activities. Here, we show for the first time that the transglutaminase genes in the basal metazoan, sea sponge *Halisarca dujardinii*, are organized in a cluster, similar to mammalian transglutaminases. The regulatory regions of six transglutaminase genes and their differential expression in the course of *H. dujardinii* life cycle suggest independent regulation of these genes. The decrease in transglutaminase activities by cystamine facilitates restoration of the sponge multicellular structures after its mechanical dissociation. For the first time we observed that this decrease in transglutaminase activities was accompanied by generation of the reactive oxygen species in the cells of a basal metazoan. The study of transglutaminases in the basal metazoans and other sea-dwelling organisms might provide better understanding of evolution and specific functions of these enzymes in higher animals.

**Keywords:** transglutaminases, *Halisarca dujardinii*, reaggregation, cystamine, reactive oxygen species

УДК 577.21+577.151.6:57.085.23

## ИЗМЕНЕНИЯ РЕДОКС-СТАТУСА И ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ БИНАЗЫ НА ВПЧ-16-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ SiHa

© 2024 г. А. И. Надырова<sup>а, \*</sup>, И. Ю. Петрушанко<sup>б</sup>, В. А. Митькевич<sup>б</sup>, О. Н. Ильинская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,  
Казань, 420008 Россия

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

\*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Вирус папилломы человека 16 типа (ВПЧ-16) относится к группе вирусов высокого риска и характеризуется гиперэкспрессией онкобелков Е6 и Е7, определяющих онкогенные свойства вируса: иммортализацию и злокачественную трансформацию пролиферирующих эпителиальных клеток. Биогенез редоксчувствительных белков Е6 и Е7 на ранних этапах вирусной инфекции приводит к блокированию антиоксидантных систем клетки и убиквитинзависимой деградации опухолевых супрессоров p53 и Rb. Поддержание высоких темпов пролиферации опухолевых клеток способствует повышению уровня продукции активных форм кислорода (АФК) и смещению окислительно-восстановительного баланса в сторону окислительных процессов. Восстановленный глутатион (GSH) через S-глутатионилирование тиоловых групп редоксчувствительных белков обеспечивает антиоксидантную защиту опухолевых клеток, что приводит к появлению лекарственно устойчивых злокачественных новообразований. В связи с этим особое значение приобретают лекарственные препараты, действие которых направлено на восстановление редокс-баланса в раковых клетках и тем самым на повышение их чувствительности к химиотерапии. Нами установлено, что в ВПЧ-16-положительной линии клеток SiHa плоскоклеточной карциномы шейки матки РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) модулирует редоксзависимые регуляторные механизмы, обеспечивающие нечувствительность этих клеток к апоптозу. Действие биназы в нетоксичных концентрациях (0.8 мкМ) инициирует ряд начальных апоптогенных изменений, а именно: снижает уровень АФК и GSH, ингибирует экспрессию онкобелка Е6, активирует экспрессию супрессора опухоли p53, снижает уровень глутатионилирования p53 и повышает глутатионилирование Na,K-АТРАЗы. Индуцированное биназой нарушение целостности мембран митохондрий является сигналом к активации митохондриального пути апоптоза.

**Ключевые слова:** биназа, редокс-статус, злокачественные клетки, глутатионилирование, p53, Na/K-АТРаза

DOI: 10.31857/S0026898424050109, EDN: HUFEUW

### ВВЕДЕНИЕ

Восстановленный глутатион (GSH) — трипептид, состоящий из трех аминокислотных остатков: L-глутамата, L-цистеина и глицина. GSH синтезируется в цитозоле, где его концентрация составляет 5–10 мМ; из цитозоля GSH транспортируется в митохондрии, эндоплазматический ретикулум, пероксисомы и ядро [1]. Ключевые функции GSH — вывод ксенобиотиков из клетки, антиоксидантная защита и редоксзависимая модификация тиоловых групп белков, в результате которой происходит

образование дисульфидного мостика между белком и глутатионом (S-глутатионилирование) [2].

В норме на долю GSH приходится около 99% от его общего внутриклеточного содержания [1, 3]. Окислительно-восстановительный потенциал пары GSH/GSSG часто используют для определения редокс-статуса клетки [3, 4]. Нарушение внутриклеточного баланса GSH/GSSG наблюдается при ряде патологий, включая нейродегенеративные заболевания, муковисцидоз, ВИЧ и злокачественные но-

вообразования [2, 5]. Редокс-статус опухолевых клеток кардинально отличается от здоровых вследствие повышенного содержания активных форм кислорода (АФК), вызванного гиперэкспрессией онкогенов *MYC* и *KRAS*, мутации в которых обнаруживают в 20–30% всех опухолей [6, 7]. Помимо антиоксидантной активности, GSH действует как детоксикант, образуя конъюгаты с химиотерапевтиками, которые затем выводятся из клетки эффлюкс-системой [8]. В связи с этим глутатион считают важным звеном разработок стратегии противоопухолевой терапии.

Сдвиг внутриклеточного редокс-статуса в более окисленную область, характерный для злокачественных клеток, индуцирует S-глутатионирование редоксчувствительных белков (киназ, факторов транскрипции, ионных транспортеров). Это защищает тиоловые группы от необратимого окисления либо приводит к изменению функциональной активности белков [9, 10]. Так, вирус папилломы человека (ВПЧ) ингибирует антиоксидантные системы клетки для активации редоксчувствительных онкобелков E6 и E7, подавляющих активность опухолевых супрессоров p53 и Rb. Злокачественная трансформация клеток SiHa поддерживается за счет экспрессии белков E6 и E7, кодируемых ВПЧ типа 16 (ВПЧ-16), относящегося к вирусам высокого канцерогенного риска [11].

Терапевтическая эффективность препаратов, направленных на восстановление редокс-статуса клетки, уже доказана при лечении некоторых онкологических заболеваний, включая промиелоцитарный лейкоз, рак пищевода, толстой кишки, молочной железы и немелкоклеточный рак легкого [12, 13]. Установлено, что РНКазы также обладают антиоксидантными свойствами. Так, РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) снижает уровень АФК в клетках Kasumi-1, меланомы В16 и Jurkat [14–16]. Таким образом, восстановление редокс-статуса опухолевых клеток РНКазой до уровня, характерного для нормы, препятствует их неконтролируемой пролиферации и приводит к повышению чувствительности клеток к апоптозу.

Здесь проанализированы опосредованные модуляцией редокс-статуса клеток и глутатионирования белков механизмы цитотоксического действия биназы на ВПЧ-16-положительные клетки SiHa плоскоклеточной карциномы шейки матки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеток.** Линию клеток SiHa – ВПЧ-16-позитивной плоскоклеточной карциномы шейки матки человека (АТСС, США) – культивировали на питательной сре-

де RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “ПанЭко”, Россия), 2 мМ глутамина (“ПанЭко”), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”), при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки засеивали в 12-луночные плоскодонные планшеты (“Nest”, Китай) и растили до образования 50%-ного монослоя.

**Ферментативная обработка клеток.** В работе использовали биназу – РНКазу *B. pumilus* дикого типа (ЕС 3.1.27.3, 109 а.о., M<sub>r</sub> 12.3 кДа, pI 9.5), полученную как описано ранее [17]. Учитывая данные V. Mitkevich и др. [18] по коэффициенту цитотоксичности биназы (CC<sub>50</sub> – 50% cytotoxicity concentration) для клеток SiHa, который составляет 1.2 ± 0.2 мкМ за 72 ч инкубации, мы использовали фермент в концентрации 0.8 мкМ. Клетки инкубировали с биназой в течение 24, 48 и 72 ч.

**Цитофлуориметрический анализ.** Внутриклеточные параметры оценивали с помощью проточного цитофлуориметра BD LSRFortessa™ (“Becton Dickinson”, США).

Процент клеток с поврежденной мембраной в популяции определяли с помощью йодида пропидия (PI; “Sigma-Aldrich”, США). Краситель в конечной концентрации 10 мкг/мл вносили в суспензию клеток за 1 мин до проведения измерений. Окрашенные PI (PI<sup>+</sup>) клетки определяли как мертвые (некротические) и исключали из рассмотрения при оценке уровня АФК, глутатиона и митохондриального потенциала.

Для определения уровня АФК клетки обрабатывали дигидрородамином 123 (DHR123; “Invitrogen”, США) в концентрации 10 мкМ.

Содержание восстановленного глутатиона, GSH, в клетках определяли с использованием красителя ThiolTracker™ Violet (“Invitrogen”), конечная концентрация которого составляла 7.5 мкМ.

Величину митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) в клетках с неповрежденной мембраной оценивали с использованием красителя MitoProbe™ DiIC<sub>1</sub>(5) (“Invitrogen”) в конечной концентрации 0.5 мкМ.

Обработанные красителями клетки инкубировали при 37°C в темноте в течение 30 мин. В клетках с неповрежденной мембраной содержание АФК и GSH оценивали по интенсивности флуоресценции зеленого цвета для соответствующих красителей, а изменение митохондриального потенциала – по изменению интенсивности флуоресценции красного цвета для красителя DiIC<sub>1</sub>(5).

**Иммуноблотинг.** Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера RIPA (25 mM Трис-НCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.1% SDS, 1% дезоксихолата натрия). Суспензию инкубировали при 4°C в течение 1 ч при перемешивании, после чего центрифугировали (10 000 g, при 4°C) и собирали супернатант. Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли методом Лоури. Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующем 10%-ном ПААГ. После разделения белки переносили на PVDF-мембрану с использованием системы Trans-Blot Turbo ("Bio-Rad", США). По окончании процесса мембраны инкубировали сначала в течение 30 мин в блокирующем буфере, содержащем 5% обезжиренного молока в PBST (50 mM Трис-НCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), а затем при 4°C в течение ночи с мышиными моноклональными антителами против следующих белков: p53 ("Santa Cruz Biotechnology", США; в разведении 1 : 1 000), E6, Na,K-АТФазы- $\alpha 1$  ("Sigma-Aldrich"; 1 : 10 000),  $\beta$ -актина ("Invitrogen"; 1 : 10 000), глутатиона ("Sigma-Aldrich"; 1 : 1 000) — или с кроличьими антителами против p53, глутатионированного по Cys141 ("Sigma-Aldrich"; 1 : 1 000). После тщательной промывки в PBST мембраны инкубировали с мечеными пероксидазой хрена козьими антителами против IgG соответственно мыши или кролика. Для визуализации результатов использовали набор SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate ("Thermo Fisher Scientific", США) на гель-документаторе ChemiDoc MP ("Bio-Rad"). Денситометрический анализ содержания белков проводили с использованием программного пакета Image Lab ("Bio-Rad").

**Статистическая обработка результатов.** Все эксперименты проведены в трех биологических повторах. Для статистической обработки данных

использовали *t*-тест Стьюдента. Значение  $p \leq 0.05$  отражало статистически значимые различия. Для статистического анализа использовали программные пакеты STATISTICA 10.0 и MS Excel 2020 ( $p \leq 0.05$ ).

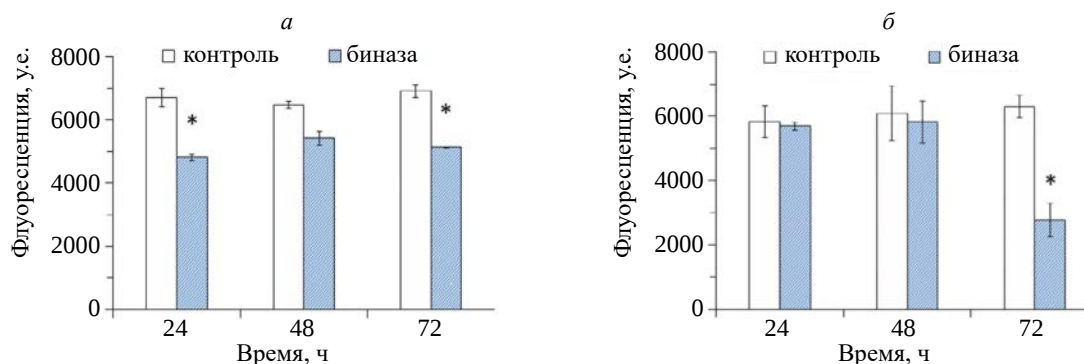
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Влияние биназы на редокс-статус клеток линии SiHa*

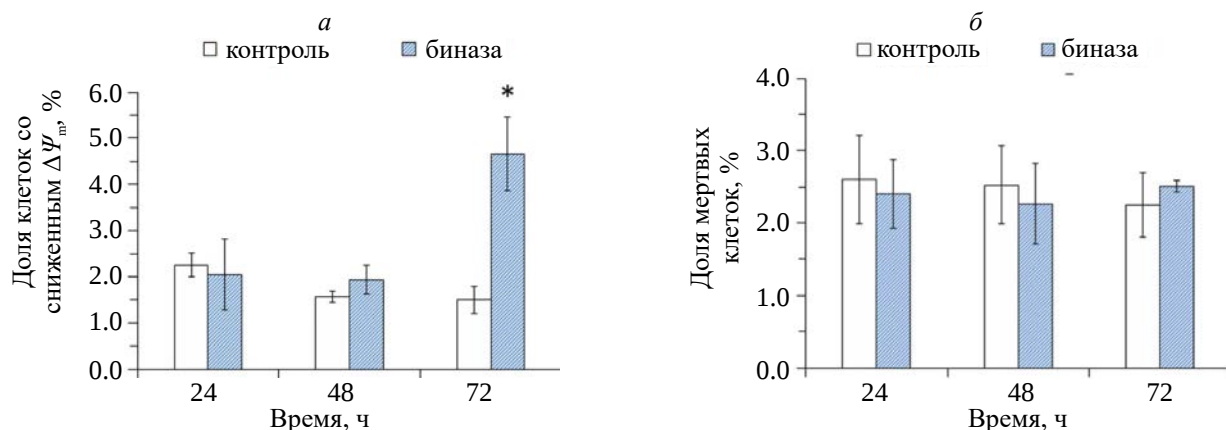
Повышенный уровень продукции АФК — следствие высоких темпов пролиферации опухолевых клеток. Адаптация клеток к избыточному уровню АФК посредством глутатионирования редоксчувствительных белков способствует увеличению их выживаемости и появлению агрессивных опухолей, обладающих лекарственной устойчивостью [19]. Влияние биназы на редокс-статус клеток SiHa оценивали по изменению уровня АФК и восстановленного глутатиона. Инкубация клеток с биназой в течение 24 ч приводила к снижению уровня АФК в клетках SiHa на 25%; при увеличении времени инкубации до 48 и 72 ч антиоксидантный эффект биназы сохранялся (рис. 1а). Уровень восстановленного глутатиона достоверно снижался только через 72 ч инкубации с биназой (рис. 1б).

### *Проапоптотический эффект биназы*

Снижение митохондриального потенциала — один из ярких маркеров внутреннего (митохондриального) пути апоптоза. Изменения митохондриального потенциала в клетках после обработки биназой в концентрации ниже  $CC_{50}$  (0.8 vs 1.2 мкМ) оценивали с помощью флуоресцентного трекера DiIC<sub>1</sub>(5), накапливающегося в митохондриях. Анализ изменения доли живых клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в течение 72 ч инкубации с биназой



**Рис. 1.** Цитофлуориметрический анализ содержания АФК (а) и восстановленного глутатиона (б) в клетках SiHa, инкубированных с биназой (0.8 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч. Результаты представлены как сигнал флуоресценции красителей DHR123 (АФК) и ThiolTracker<sup>TM</sup> Violet (GSH), полученный от клеток, инкубированных с биназой, относительно необработанных. \* $p \leq 0.05$ .



**Рис. 2.** Цитофлуориметрический анализ содержания клеток со сниженным митохондриальным потенциалом (а) и мертвых клеток (б) после обработки биназой (0.8 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч. \* $p \leq 0.05$ .

приведен на рис. 2а. Как видно, резкий рост доли клеток со сниженным митохондриальным потенциалом зарегистрирован через 72 ч; при этом увеличения доли мертвых клеток не наблюдали (рис. 2б).

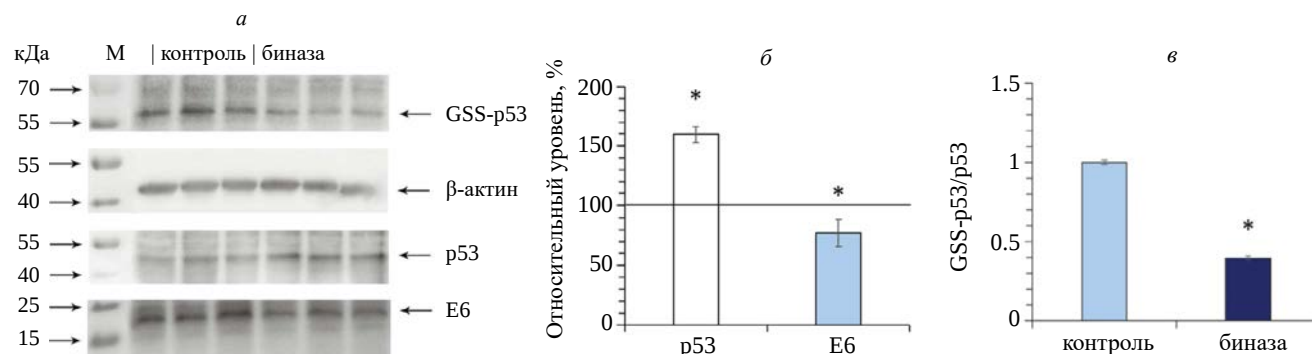
#### Влияние биназы на глутатионирование p53 и Na,K-АТФазы

Чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическому действию биназы зависит от экспрессии специфических онкогенов: KIT, RUNX1 (AML1-ETO), FLT3 и KRAS [20–22]. Линия клеток SiHa, ВПЧ-16-положительной плоскоклеточной карциномы шейки матки, характеризуется экспрессией редоксчувствительных вирусных онкобелков Е6 и Е7. Их основная функция заключается в блокировании антиоксидантных систем и подавлении опухолевых супрессоров p53 и Rb. Так, вирусный белок Е6 индуцирует убиквитинзависимую деградацию онкосупрессора p53 [23]. Кроме того, известно, что в условиях оксидативного стресса белок p53

подвергается редоксзависимому глутатионированию, что препятствует его связыванию с ДНК и, как следствие, реализации противоопухолевой активности [24].

Как видно из данных, представленных на рис. 3, инкубация клеток SiHa с биназой в концентрации 0.8 мкМ приводит к снижению экспрессии вирусного белка Е6 и усилению биогенеза p53. Это согласуется с результатами, полученными нами ранее для более высоких концентраций фермента (8 мкМ) [18]. Кроме того, в присутствии биназы снижен уровень глутатионирования белка p53 (рис. 3), что повышает его онкосупрессорный потенциал.

Na,K-АТФаза относится к ключевым редокс-чувствительным белкам клетки. Функциональная активность этого фермента напрямую зависит от окислительно-восстановительного статуса клетки и снижается при окислительном стрессе, гипоксии и глутатионировании каталитической  $\alpha 1$ -субъединицы [25]. Раковые клетки характеризуются повышенной актив-



**Рис. 3.** Влияние биназы на уровни белков Е6 ВПЧ-16 и p53 в клетках SiHa. а – Электрофоретический анализ белков в лизатах клеток SiHa. Здесь и далее: М – маркеры молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США), контроль – необработанные клетки; биназа – клетки инкубировали с 0.8 мкМ биназой в течение 48 ч. б – Относительное содержание белков p53 и Е6 в лизатах, обработанных биназой, клеток SiHa. За 100% принят уровень соответствующих белков в контроле. в – Изменение степени глутатионирования белка p53 (GSS-p53) при обработке клеток SiHa биназой. Кратность изменения рассчитывали как GSS-p53/p53; за единицу принято значение GSS-p53/p53 в контроле. \* $p \leq 0.05$ .

ностью Na,K-АТФазы, поэтому ингибиторы ее ферментативной активности относятся к перспективным препаратам для лечения онкологических заболеваний [26, 27].

Нами показано, что в клетках SiHa, инкубированных с биназой в концентрации 0.8 мкМ в течение 48 ч, уровень Na,K-АТФазы снижался на 45% относительно необработанных клеток; при этом на 20% повышалось содержание глутатионилированной формы каталитической  $\alpha 1$ -субъединицы фермента (рис. 4). Все эти процессы приводит к ингибированию АТФазной активности фермента и, как следствие, к нарушению ионного гомеостаза и последующему апоптозу клеток. Таким образом, конечным результатом действия биназы даже в нетоксичной концентрации можно считать ее проапоптотический эффект.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

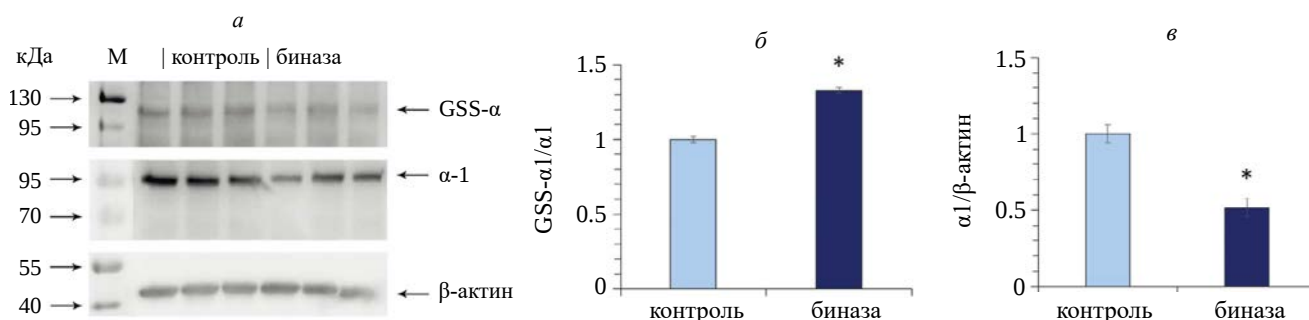
### Антиоксидантный потенциал биназы

Антиоксидантная функция восстановленного глутатиона, GSH, заключается в предотвращении развития окислительного стресса, защите белков от необратимого окисления и поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках. GSH взаимодействует с окисленными формами молекул и АФК как напрямую, так и в качестве косубстрата фермента глутатионпероксидазы. В ходе ферментативной реакции глутатионпероксидаза восстанавливает  $H_2O_2$  и перекиси липидов до воды и соответствующих спиртов [28]. Детоксикация ксенобиотиков также одна из важнейших функций GSH. В реакции, катализируемой глутатион-S-трансферазой, GSH образует конъюгаты с электрофильными ксенобиотиками. Такие конъюгаты (GS-X) выбрасываются из клетки ABC-транспортером MRP1 (multidrug resistance protein 1), что приводит к развитию лекарственной устойчивости опухолевых клеток [29, 30].

Изучению антиоксидантной активности РНКаз животного и бактериального происхождения посвящен ряд исследований. Так, В. Ardelt с соавт. [31] установили снижение АФК в клетках канальцевой карциномы молочной железы и фибросаркомы после обработки РНКазой из ооцитов лягушки *Rana pipiens* (онконазой). На модели опухолевых клеток Kasumi-1 В. Митькевич (Mitkevich) с соавт. [15] выявили дозозависимое снижение продукции АФК под действием биназы. Интересно отметить, что оно коррелировало с ростом внутриклеточного кальция и процента апоптотических клеток. Подавление окислительного стресса в клетках Jurkat после обработки биназой коррелировало со снижением уровня экспрессии транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B1, при этом возрастала доля клеток в состоянии апоптоза [16]. Онконаза также снижала уровень экспрессии NF- $\kappa$ B1 в клетках мезотелиомы [32]. Известно, что повышенное содержание АФК в клетках индуцирует экспрессию NF- $\kappa$ B, что приводит к активации генов пролиферации и снижению чувствительности клеток апоптозу. По-видимому, подавление продукции АФК и снижение уровня NF- $\kappa$ B характерны для цитотоксичных РНКаз различного происхождения. Установленное нами снижение уровня АФК в клетках SiHa после инкубации с биназой в нетоксичной концентрации, по-видимому, тоже связано с этим механизмом. Наблюдаемое под действием биназы снижение уровня АФК в клетках SiHa, предшествующее снижению уровня глутатиона и индукции падения митохондриального потенциала, является еще одним подтверждением важности антиоксидантной активности РНКаз в реализации их цитотоксического действия.

### Проапоптотический потенциал биназы

Более 200 белков млекопитающих участвует в тиол-дисульфидном обмене [33, 34]. Установлено, что S-глутатионирование ингибирует активность ядерного фактора NF1,



**Рис. 4.** Влияние биназы на уровень  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в клетках SiHa. а – Электрофоретический анализ содержания  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в клетках SiHa. Обозначения см. в подписи к рис. 3. Изменение степени глутатионирования (б) и содержания (в)  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в лизатах клеток SiHa, обработанных биназой. За единицу приняты значения в контроле. \* $p \leq 0.05$ .

актина, транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, опухолевого супрессора p53 и киназы I $\kappa$ B (IKK). Функционирование клеточного актина происходит при посредничестве обратимого S-глутатионилирования, нарушение которого меняет структурную организацию стресс-фибрилл актинового цитоскелета [35]. Сохранение оптимального соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (GSH/GSSG) в клетке — ключевой фактор ее нормального функционирования. Дисбаланс GSH/GSSG, вызванный ингибированием синтеза GSH, приводит к редоксзависимой активации сигнальных путей ERK/JNK/p38 и запуску апоптоза [36–38]. Баланс GSH/GSSG сдвигается в сторону GSSG при развитии окислительного стресса, что индуцирует глутатионилирование белков [25]. Таким образом, повышенный уровень АФК, характерный для опухолевых клеток, индуцирует глутатионилирование белков, что в ряде случаев изменяет их функционирование. Так, глутатионилирование транскрипционного фактора p53 препятствует его связыванию с молекулой ДНК. Это приводит к тому, что опухолевые клетки реализуют механизм адаптации, который подавляет развитие апоптотического ответа на ранней стадии окислительного стресса, и тем самым избегают немедленной гибели [39]. Здесь нами показано, что снижение уровня АФК в клетках SiHa под действием биназы приводит к уменьшению степени глутатионилирования p53 (рис. 3а). Ранее V. Mitkevich и др. [18] показали, что под действием биназы в этих клетках снижалась экспрессия белка E6 ВПЧ-16, что сопровождалось повышением уровня p53. Таким образом, биназа даже в низкой, нетоксичной концентрации оказывает проапоптотический эффект на клетки SiHa. Увеличение транскриптов белка p53 под действием биназы ранее было показано и на моделях опухолевых клеток HEK293T [40].

Интересно отметить, что при инкубации с биназой уровень глутатионилирования мембранного белка Na,K-АТФазы возрастает (рис. 4а,б), а это, как показано нами ранее [25], приводит к ингибированию ее активности и, как следствие, снижению выживаемости опухолевых клеток. Возрастание глутатионилирования Na,K-АТФазы под действием биназы (0.8 мкМ) было нами показано ранее и на клетках Kasumi-1 миелогенного лейкоза [41]. Ключевая функция Na,K-АТФазы в клетке заключается в поддержании ионного гомеостаза и трансмембранного потенциала. В раковых клетках активность Na,K-АТФазы часто повышена в связи с особенностями их метаболизма. Во многих типах раковых клеток замечена активация каталитической

$\alpha$ 1-субъединицы этого фермента [42]. Кроме того, в опухолевых клетках некаталитическая  $\beta$ -субъединица Na,K-АТФазы играет ключевую роль в механизмах клеточной адгезии и миграции, а ее блокирование приводит к опухолевой инвазии и метастазированию [43]. В связи с этим Na,K-АТФаза может служить перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Кардиотонические стероиды (КТС), содержащиеся в том числе в организме человека, относятся к специфическим ингибиторам и регуляторам Na,K-АТФазы. Длительное время КТС применяли для лечения сердечной недостаточности, так как ингибирование Na,K-АТФазы и, как следствие, увеличение концентрации кальция приводит к усилению сердечных сокращений [44]. В ряде исследований показана эффективность таких КТС, как убаин, дигиталин и буфалин, в лечении рака простаты [45, 46], хотя для некоторых препаратов этой группы повышен риск возникновения онкологических заболеваний [47]. Терапевтический индекс большинства КТС, обладающих противоопухолевой активностью, достаточно низок, что ограничивает перспективы их применения в лечении онкологических заболеваний. В то же время биназа в концентрации 0.8 мкМ блокирует активность Na,K-АТФазы, снижая адаптивный потенциал опухолевых клеток, что обосновывает возможность применения в противоопухолевой терапии даже малых доз этой РНКазы.

Митохондрии играют ключевую роль в инициации Bcl-2-зависимого механизма апоптоза опухолевых клеток. Падение митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) приводит к изменению проницаемости мембран, ускорению высвобождения апоптотических факторов (цитохром c, Smac/Diablo и AIF), активации каспаз и, как следствие, к гибели клеток [48]. Так, в диабетических кардиомиоцитах стресс-индуцированное окисление митохондриального GSH приводило к снижению  $\Delta\Psi_m$ , активации каспазы-9 и каспазы-3 [49]. В клетках В-клеточной лимфомы человека АФК-зависимое снижение митохондриального глутатиона (mGSH) инициировало апоптоз и сопровождалось резким падением  $\Delta\Psi$ , высвобождением цитохрома c и активацией каспазы-3 [50]. Нами показано, что в клетках SiHa через 72 ч инкубации с биназой снижается как уровень глутатиона, так и величина митохондриального потенциала, то есть нарушается работа митохондрий. Ранее показано, что индуцированный биназой апоптоз клеток Kasumi-1 и HEK293T опосредован деполаризацией мембран митохондрий и повышением содержания  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток [15, 51]. Вероятно, снижение митохондриального потенциала

в клетках SiHa также служит ранним маркером последующих апоптотических изменений.

Таким образом, нами установлено, что биназа в низких концентрациях приводит к снижению уровня АФК, индуцируя снижение глутатионирования p53, повышению уровня немодифицированного p53 и тем самым способствует восстановлению нормальной функции белка p53 в клетках SiHa – ВПЧ-16-положительной плоскоклеточной карциномы. Падение уровня восстановленного глутатиона под действием биназы, вероятно, вносит вклад в падение митохондриального потенциала, что индуцирует развитие митохондриального пути апоптоза. Под действием биназы уровень Na,K-АТРазы снижается и увеличивается доля глутатионированной формы. Логично предположить, что это приводит к падению ферментативной активности Na,K-АТРазы в клетке, а значит и нарушению ионного гомеостаза. Следовательно, в низких концентрациях биназа снижает защитные свойства раковых клеток за счет нормализации работы редоксчувствительных систем и изменения глутатионирования ряда белков. Полученные результаты позволяют рассматривать биназу в качестве агента, регулирующего редокс-баланс опухолевых клеток в составе комплексной терапии онкопатологий.

Работа выполнена в рамках программы “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) и гранта ICGEB (CRP/RUS20-01).

Настоящее исследование проводилось без использования биологических материалов, полученных от людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Green R.M., Graham M., O'Donovan M.R., Chipman J.K., Hodges N.J. (2006) Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. **21**, 383–390. doi: 10.1093/mutage/gel043
- Kennedy L., Sandhu J.K., Harper M.E., Cuperlovic-Culf M. (2020) Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies. *Biomolecules*. **10**, 1429. doi: 10.3390/biom10101429.
- Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–1212. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00480-4
- Buettner G.R., Wagner B.A., Rodgers V.G. (2013) Quantitative redox biology: an approach to understand the role of reactive species in defining the cellular redox environment. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 477–483. doi: 10.1007/s12013-011-9320-3
- Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145–155. doi: 10.1016/S0753-3322(03)00043-X
- Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T.K., Hampton G.M., Wahl G.M. (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell*. **9**, 1031–1044. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00520-8
- Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G., Budinger S., Chandel N.S. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 8788–8793. doi: 10.1073/pnas.1003428107
- Ballatori N., Krance S.M., Marchan R., Hammond C.L. (2009) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* **30**, 13–28. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.004
- Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sables E.A., Shelton M.D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988. doi: 10.1089/ars.2008.2089
- Miller O.G., Mieyal J.J. (2015) Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases. *Arch. Toxicol.* **89**, 1439–1467. doi: 10.1007/s00204-015-1496-7
- Xue X., Wang B., Du W., Zhang C., Song Y., Cai Y., Cen D., Wang L., Xiong Y., Jiang P., Zhu S., Zhao K.N., Zhang L. (2016) Generation of antibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. *Oncotarget*. **7**, 73995–74005. doi: 10.18632/oncotarget.12174
- Wondrak G.T. (2009) Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 3013–3069. doi: 10.1089/ars.2009.2541
- Tew K.D., Townsend D.M. (2011) Redox platforms in cancer drug discovery and development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 156–161. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.016
- Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle*. **12**, 2120–2131. doi: 10.4161/cc.25164

15. 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**, 1344–1349. doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.016
16. Бурнышева К.М., Петрушанко И.Ю., Спирин П.В., Прасолов В.С., Макаров А.А., Митькевич В.А. (2016) Рибонуклеаза биназа вызывает гибель клеток острого Т-лимфобластного лейкоза, индуцируя в них апоптоз. *Молекуляр. биология*. **50**, 347–352. doi: 10.7868/S0026898416020038
17. Шульга А.А., Огороков А.Л., Панов К.И., Курбанов Ф.Т., Чернов Б.К., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. (1994) Суперпродукция рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P (биназы) в *E. coli*. *Молекулярная биология*. **28**(2), 453–463.
18. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. (2017) Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget*. **8**, 72666–72675. doi: 10.18632/oncotarget.20199
19. Pal D., Rai A., Checker R., Patwardhan R.S., Singh B., Sharma D., Sandur S.K. (2021) Role of protein S-glutathionylation in cancer progression and development of resistance to anti-cancer drugs. *Arch. Biochem. Biophys.* **704**, 108890. doi: 10.1016/j.abb.2021.108890
20. 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**, 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005
21. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prasolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2011) Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle*. **10**, 4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210
22. Митькевич В.А., Орлова Н.Н., Петрушанко И.Ю., Симоненко О.В., Спирин П.В., Прокофьева М.М., Горностаева А.С., Stocking C., Макаров А.А., Прасолов В.С. (2013) Экспрессия онкогена *FLT3-ITD* сообщает предшественникам В-клеток мыши линии BAF3 чувствительность к цитотоксическому действию биназы. *Молекуляр. биология*. **47**, 282–282. <https://doi.org/10.7868/S0026898413020092>
23. Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 342–350. doi: 10.1038/Nrc798
24. Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*. **46**, 7765–7780. doi: 10.1021/bi700425y
25. Petrushanko I.Y., Yakushev S., Mitkevich V.A., Kamanina Y.V., Ziganshin R.H., Meng X., Anashkina A.A., Makhro A., Lopina O.D., Gassmann M., Makarov A.A., Bogdanova A. (2012) S-glutathionylation of the Na, K-ATPase catalytic  $\alpha$  subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.* **287**, 32195–32205. doi: 10.1074/jbc.M112.391094
26. Alevizopoulos K., Calogeropoulou T., Lang F., Stournaras C. (2014) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors in cancer. *Curr. Drug Targets*. **15**, 988–1000. doi: 10.2174/1389450115666140908125025
27. Bejček J., Spiwok V., Kmoníčková E., Rimpelová S. (2021) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase revisited: on its mechanism of action, role in cancer, and activity modulation. *Molecules*. **26**, 1905. doi: 10.3390/molecules26071905
28. Lushchak V.I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*. **2012**, 736837. doi: 10.1155/2012/736837
29. Zou J., Shang X., Li C., Ouyang J., Li B., Liu X. (2019) Effects of cadmium on mineral metabolism and antioxidant enzyme activities in *Salix matsudana* Koidz. *Pol. J. Environ. Stud.* **28**, 989–999. doi: 10.15244/pjoes/81697
30. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. (2018) Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*. **7**, 8. doi: 10.1037/s41389-017-0025-3
31. Ardelt B., Juan G., Burfeind P., Salomon T., Wu J.M., Hsieh T.C., Li X., Sperry R., Pozarowski P., Shogen K., Ardelt W., Darzynkiewicz Z. (2007) Onconase, an anti-tumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress. *Int. J. Oncol.* **31**, 663–669. doi: 10.3892/ijo.31.3.663
32. Tsai S.Y., Ardelt B., Hsieh T.C., Darzynkiewicz Z., Shogen K., Wu J.M. (2004) Treatment of Jurkat acute T-lymphocytic leukemia cells by onconase (Ranpirinase) is accompanied by an altered nucleocytoplasmic distribution and reduced expression of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Int. J. Oncol.* **25**, 1745–1752. doi: 10.3892/ijo.25.6.1745
33. Fratelli M., Gianazza E., Ghezzi P. (2004) Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins. *Expert Rev. Proteomics*. **1**, 365–376. doi: 10.1586/14789450.1.3.365
34. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 883–898. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014
35. Fiaschi T., Cozzi G., Raugi G., Formigli L., Ramponi G., Chiarugi P. (2006) Redox regulation of  $\beta$ -actin during integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**, 22983–22991. doi: 10.1074/jbc.M603040200

36. Lu G.D., Shen H.M., Chung M.C., Ong C.N. (2007) Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis*. **28**, 1937–1945. doi: 10.1093/carcin/bgm143
37. Cuadrado A., Garcia-Fernandez L.F., Gonzalez L., Suarez Y., Losada A., Alcaide V., Martinez T., Fernandez-Sousa J.M., Sanchez Puelles J.M., Munoz A. (2003) Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **278**, 241–250. doi: 10.1074/jbc.M201010200
38. Ji L., Shen K., Jiang P., Morahan G., Wang Z. (2011) Critical roles of cellular glutathione homeostasis and jnk activation in andrographolide-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Mol. Carcinog.* **50**, 580–591. doi: 10.1002/mc.20741
39. Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*. **46**, 7765–7780. doi: 10.1021/bi700425y
40. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2010) Oncogenic *c-kit* transcript is a target for binase. *Cell Cycle*. **9**, 2674–2678. doi: 10.4161/cc.9.13.12150
41. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Makarov A.A. (2019) RNases disrupt the adaptive potential of malignant cells: perspectives for therapy. *Front. Pharmacol.* **10**, 922. doi: 10.3389/fphar.2019.00922
42. Mijatovic T., Dufrasne F., Kiss R. (2012) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cancer. *Pharm. Pat. Anal.* **1**, 91–106. doi: 10.4155/ppa.12.3
43. Eskiocak U., Ramesh V., Gill J.G., Zhao Z., Yuan S.W., Wang M., Vandergriff T., Shackleton M., Quintana E., Frankel A., Johnson T., DeBerardinis R., Morrison S.J. (2016) Synergistic effects of ion transporter and MAP kinase pathway inhibitors in melanoma. *Nat. Commun.* **7**, 12336. doi: 10.1038/ncomms12336
44. Ren J., Gao X., Guo X., Wang N., Wang X. (2022) Research progress in pharmacological activities and applications of cardiotonic steroids. *Front. Pharmacol.* **13**, 902459. doi: 10.3389/fphar.2022.902459
45. Ayogu J.I., Odoh A.S. (2020) Prospects and therapeutic applications of cardiac glycosides in cancer remediation. *ACS Comb. Sci.* **22**, 543–553. doi:10.1021/acscombsci.0c00082
46. Chang Y.M., Shih Y.L., Chen C.P., Liu K.L., Lee M.H., Lee M.Z., Hou H.T., Huang H.C., Lu H.F., Peng S.F., Chen K.W., Yeh M.Y., Chung J.G. (2019) Ouabain induces apoptotic cell death in human prostate DU 145 cancer cells through DNA damage and TRAIL pathways. *Environ. Toxicol.* **34**, 1329–1339. doi:10.1002/tox.22834
47. Osman M.H., Farrag E., Selim M., Osman M.S., Hasanine A., Selim A. (2017) Cardiac glycosides use and the risk and mortality of cancer; systematic review and meta-analysis of observational studies. *PloS One*. **12**, e0178611. doi: 10.1371/journal.pone.0178611
48. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. (2011) Glutathione in cancer cell death. *Cancers*. **3**, 1285–1310. doi: 10.3390/cancers3011285
49. Ghosh S., Pulinilkunnil T., Yuen G., Kewalramani G., An D., Qi D., Abrahani A., Rodrigues B. (2005) Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H768–H776. doi: 10.1152/ajpheart.00038.2005
50. Armstrong J.S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J.M., Lecane P., Birrell G.W., Peehl D.M., Knox S.J. (2002) Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* **9**, 252–263. doi: 10.1038/sj.cdd.4400959
51. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) Binase and other microbial RNases as potential anti-cancer agents. *BioEssays*. **30**, 781–790. doi: 10.1002/bies.20789

## Redox Status and Protein Glutathionylation in Binase-Treated HPV16-Positive SiHa Carcinoma Cells

A. I. Nadyrova<sup>1, \*</sup>, I. Y. Petrushanko<sup>2</sup>, V. A. Mitkevich<sup>2</sup>, O. N. Ilinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

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

\*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Human papillomavirus type 16 (HPV16) belongs to the high-risk type viruses and is associated by overexpression of E6 and E7 oncoproteins, which determine the oncogenic properties of the virus such as immortalization and malignant transformation of proliferating epithelial cells. The biogenesis of redox-sensitive proteins E6 and E7 at the early stages of viral infection leads to blocking of cell antioxidant defense system and ubiquitin-dependent degradation of p53 and Rb tumor suppressors. Maintaining high rates of tumor cell proliferation contributes to an increase in the reactive oxygen species (ROS) production level and a shift in the redox balance towards oxidative processes. Reduced glutathione (GSH) provides antioxidant protection to tumor cells through S-glutathionylation of thiol groups of redox-sensitive proteins, which leads to the appearance of multidrug-resistant forms of cancer. In this regard, drugs restoring redox balance and increasing susceptibility to antitumor therapy are of particular importance. We have established that in HPV-16-positive SiHa cells of cervical squamous cell carcinoma, *Bacillus pumilus* RNase (binase) modulates the redox-dependent regulatory mechanisms that ensure tumor cell resistance to apoptosis. Binase in nontoxic concentrations initiates a number of pre-apoptogenic changes, i.e., decreases ROS and GSH levels, suppresses the expression of E6 oncoprotein, activates the expression of p53 tumor suppressor, and reduces the mitochondrial potential of tumor cells. Binase-induced disruption of the mitochondrial membrane integrity is a signal for the mitochondrial apoptosis pathway activation.

**Keywords:** binase, redox status, malignant cells, glutathionylation, p53, Na/K-ATPase

УДК 575:599.9

## ЭКСПРЕССИЯ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И БЕЛОККОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

© 2024 г. В. А. Маркелов<sup>a, b</sup>, Г. Ф. Корыгина<sup>a, b, \*</sup>, Ю. Г. Азнабаева<sup>b</sup>,  
И. А. Гибадуллин<sup>b</sup>, Л. З. Ахмадишина<sup>a, c</sup>, Т. Р. Насибуллин<sup>a</sup>, О. В. Кочетова<sup>a</sup>,  
А. М. Авзалетдинов<sup>b</sup>, Н. Ш. Загидуллин<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>b</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

<sup>c</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450064 Россия

\*e-mail: guly\_kory@mail.ru

Поступила в редакцию 23.01.2024 г.

После доработки 10.04.2024 г.

Принята к публикации 22.04.2024 г.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — многофакторное хроническое гетерогенное воспалительное заболевание дыхательной системы. Молекулярный патогенез ХОБЛ может включать нарушение регуляции стрессовых реакций, связанных с клеточным старением и затрагивающих различные сигнальные каскады и их эпигенетические регуляторы, в том числе длинные некодирующие РНК (днРНК). С целью оценки вклада генов, связанных с клеточным старением и окислительным стрессом, в молекулярный патогенез ХОБЛ проведен анализ профиля экспрессии днРНК (TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNM3OS, MEG3) и белоккодирующих генов (*PTE**N*, *TGFB*2, *FOXO*3, *KEAP*1) в мононуклеарных клетках крови больных ХОБЛ ( $n = 92$ ) и здоровых доноров ( $n = 81$ ). Установлено значимое снижение уровней экспрессии днРНК TP53TG1, DNM3OS и мРНК TGFB2 и повышение экспрессии днРНК MALAT1 и LINC00342 у больных ХОБЛ. По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа получена высокоинформативная прогностическая модель развития ХОБЛ, которая включает одновременную оценку уровня экспрессии днРНК TP53TG1 и мРНК TGFB2 ( $AUC = 0.92$ ). Найдена положительная корреляция уровней экспрессии MALAT1, DNM3OS, TGFB2, FOXO3 и KEAP1 с параметрами функции легочного дыхания, отражающими прогрессирование заболевания. Гены, экспрессия которых в мононуклеарных клетках крови больных ХОБЛ отличалась от экспрессии в контрольной группе (днРНК TP53TG1, LINC00342, DNM3OS, MALAT1 и белоккодирующий ген *TGFB*2) участвуют в регуляции апоптоза, воспаления, фиброгенеза и эпителиально-мезенхимального перехода, что может указывать на активную роль процессов клеточного старения в молекулярном патогенезе ХОБЛ.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, окислительный стресс, клеточное старение, длинные некодирующие РНК

DOI: 10.31857/S0026898424050119, EDN: HUEBQI

Сокращения: ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход, ИЛФ — идиопатический легочный фиброз, днРНК — длинная некодирующая РНК, МНК — мононуклеарные клетки крови, ЖЕЛ — жизненная емкость легких, ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких, ОФВ1 — объем форсированного выдоха за первую секунду.

## ВВЕДЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — многофакторное хроническое гетерогенное воспалительное заболевание, затрагивающее дистальные отделы дыхательных путей (бронхи, бронхиолы) и легочную паренхиму с развитием эмфиземы легких [1]. ХОБЛ, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, относится к главным причинам роста смертности в мире, что объясняет постоянный поиск новых подходов к диагностике и лечению данной патологии [2]. ХОБЛ развивается в результате комплексного взаимодействия молекулярно-генетических факторов, сети эпигенетических регуляторов и внешнесредовых воздействий, тесно связанных с образом жизни [3].

Вдыхание частиц сигаретного дыма и других поллютантов, активация воспалительных клеток (макрофагов и нейтрофилов) приводят к развитию окислительного стресса [2, 3], который считается ключевым фактором ускоренного клеточного старения, так как активные формы кислорода вызывают повреждения структуры клеток [4].

Появляется все больше доказательств связи ХОБЛ с ускоренным старением и избыточным накоплением стареющих клеток в состоянии необратимой остановки клеточного цикла [5]. Для ХОБЛ характерно повреждение и укорочение теломер [6] и повреждение ДНК [7], заметное снижение регенеративной способности базальных и эпителиальных альвеолярных клеток типа II [8], накопление клеток с выраженным секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP) [7].

Особый интерес представляют механизмы, связанные с функцией длинных некодирующих РНК (днРНК), которые играют важную роль в регуляции различных внутриклеточных сигнальных путей и формировании различных патологических фенотипов [9]. Ядерные формы днРНК участвуют в компартментализации ядра, регуляции сплайсинга и активности генов путем аллостерического взаимодействия с транскрипционными факторами, поддержания структуры эухроматина/формирования гетерохроматина [10]. Цитоплазматические формы днРНК связываются с микроРНК, препятствуя ингибированию ими мРНК, и таким образом выступают в роли конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA), регулируют модификацию структуры белков, служат каркасом для белков сигнальных путей и участвуют в формировании межклеточных контактов [11].

Ранее мы описали роль днРНК и клеточного старения в патогенезе ХОБЛ [12], в данной ра-

боте приведены результаты определения профиля экспрессии ряда днРНК и белоккодирующих генов, тем или иным образом вовлеченных в регуляцию клеточного старения у больных ХОБЛ. Ген *TP53TG1* (TP53 target 1), кодирующий одноименную днРНК и индуцируемый белком-супрессором p53, расположен на хромосоме 7q21, участвует в ответе клетки на повреждение и является частью сигнального пути TP53 [13]. днРНК TP53TG1 ингибирует WNT/ $\beta$ -катенин, способствует апоптозу клеток через активацию синтеза фермента PTEN и ингибирования сигнального пути PI3K/AKT [13, 14], связанного с такими процессами, как пролиферация, адгезия, миграция, инвазия, метаболизм, выживание и клеточное старение [15]. Ген *LINC00342* (long intergenic non-protein coding RNA 342), локализованный на хромосоме 2 (2q11.1), кодирует одноименную днРНК, экспрессия которой повышена в тканях немелкоклеточного рака легкого [16]. днРНК LINC00342 связывается с miR-203a-3p [17], что приводит к подавлению противоопухолевой активности белков p53 и PTEN [18]. Ген *DNM3OS* (dynammin 3 opposite strand/antisense RNA) локализован на хромосоме 1q24.3, транскрибируется с образованием днРНК и включает последовательности трех микроРНК: miR-199a-5p, miR-199a-3p и miR-214-3 [19]. DNM3OS является специфичным для фибробластов эффектором фиброза легкого, индуцированного TGF- $\beta$  [20]. Ген *MALAT1* (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) локализован на хромосоме 11q13.1, участвует в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс и процессов клеточного старения [21]. MALAT1 подавляет экспрессию TP53 на уровне пре-мРНК, усиливает экспрессию *MMP9*, *PIK3CA* и активирует сигнальный каскад PI3K/AKT, связанный с клеточным старением [21]. Ген *H19* (imprinted maternally expressed transcript) расположен на хромосоме 11p15.5, днРНК H19 действует как ключевой компонент регуляторных сетей, вовлеченных в патогенез некоторых видов рака [22] и фиброза за счет стимуляции аутофагии, ингибирования апоптоза и усиления эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), активации сигнальных путей TGF- $\beta$ /SMAD3 и mTOR [23, 24]. Ген *MEG3* (maternally expressed 3) локализован в области 14q32.2; днРНК MEG3 регулирует митохондриальный путь апоптоза, активируя p53 и ингибируя Bcl-x1 [25]. Сверхэкспрессия MEG3 приводит к снижению уровня TGF- $\beta$ 1, активности пути PI3K/AKT и ЭМП [26]. Ген *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) расположен в локусе 10q23, кодирует белок, который является функциональным антагонистом сигнального пути PI3K/AKT/m-TOR [27] и играет существенную роль в гликолизе, глюконеогенезе, синтезе гликогена, метаболизме липидов,

а также в митохондриальном метаболизме [28]. Ген *TGFB2*, локализованный в локусе 1q41, кодирует белок, входящий в семейство TGF- $\beta$ , который регулирует пролиферацию, дифференцировку, миграцию, регенерацию и апоптоз клеток, а также ремоделирование межклеточного матрикса и индукцию ЭМП [29]. Цитокины, входящие в семейство TGF- $\beta$ , являются лигандами рецепторов TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, активируют канонический сигнальный путь TGF- $\beta$ /SMAD2/SMAD3/SMAD4 [30]. Ген *FOXO3*, расположенный в локусе 6q21, кодирует белок, входящий в семейство транскрипционных факторов FOX (подкласс FOXO) [31]. FOXO3 контролируется преимущественно сигнальным путем PI3K/AKT, в активной дефосфорилированной форме FOXO3 связан с контролем метаболизма белков, аутофагии и апоптоза клеток [30]. Ген *KEAP1* (kelch like ECH associated protein 1), расположенный в 19p13.2, кодирует эндогенный ингибитор транскрипционного фактора Nrf2 (NFE2 like bZIP transcription factor 2). Комплекс KEAP1-NRF2 регулирует процессы окислительного гомеостаза, старения и выживания клеток [32].

С целью оценки вклада генов, кодирующих молекулы ключевых сигнальных каскадов, связанных с окислительным стрессом и клеточным старением, в молекулярный патогенез ХОБЛ, проанализирован профиль экспрессии днРНК (TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNMT3OS, MEG3) и белоккодирующих генов (*PTEN*, *TGFB2*, *FOXO3*, *KEAP1*) в мононуклеарных клетках крови больных ХОБЛ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование проведено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики, одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН (протокол № 19, от 01.11.2022). От всех участников получено информированное добровольное согласие на использование биологического материала. Исследование проводили методом случай–контроль: больные ХОБЛ ( $n = 92$ ) и контрольная группа ( $n = 81$ ). Все пациенты с ХОБЛ были госпитализированы в отделение пульмонологии городской клинической больницы № 21 или торакальное отделение клиники Башкирского государственного медицинского университета г. Уфы. Диагноз ХОБЛ устанавливали с учетом рекомендаций рабочей группы “Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких” (<http://goldcopd.org>) на основании клинических и лабораторно-инструментальных исследований,

включая компьютерную томографию высокого разрешения, спирометрию.

Все пациенты получали двойную бронходилатационную терапию: длительно действующие  $\beta_2$ -агонисты в комбинации с длительно действующими антихолинэргетиками, согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ХОБЛ [1]. Забор крови для выделения РНК из мононуклеарных клеток крови (МНК) проводили вне обострения заболевания.

В контрольную группу вошли неродственные индивиды, не имевшие хронических заболеваний в анамнезе, в том числе болезней органов дыхания, а также острых респираторных заболеваний на момент сбора биоматериала. В рамках клинко-инструментального обследования у всех участников определяли индекс массы тела (ИМТ), показатели внешнего дыхания (жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), соотношение ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ), а также долю курящих пациентов с вычислением индекса курения. Критериями включения в контрольную группу были нормальные показатели функции внешнего дыхания (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ > 70%, ОФВ<sub>1</sub> > 80%) и возраст старше 45 лет. В табл. 1 представлена клинко-демографическая характеристика исследуемых групп.

**Анализ взаимодействия днРНК, микроРНК и мРНК.** С использованием геномных баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [<https://www.kegg.jp/>], TarBase v8.0 [<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/diana/web/index.php?r=tarbasev8>] miRTarBase v8.0 ([https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase\\_2019/php/download.php](https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2019/php/download.php)) проведен предварительный анализ *in silico* для идентификации сети взаимодействующих мРНК, микроРНК, днРНК, вовлеченных в ключевые сигнальные каскады, связанные с окислительным стрессом и клеточным старением. На основе онлайн-инструментов NetworkAnalyst 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca/NetworkAnalyst/>) и Lncrna2target V3.0 (<http://bio-annotation.cn/lncrna2target/browse.jsp>, дата доступа 17-23.08.2023) [33] интерпретирован список генов для определения парных взаимодействий в сети. Файлы, содержащие параметры узлов и ребер сети, модифицированы в соответствии с дополнительными данными, полученными на основе анализа списка исследуемых генов в базе данных NCBI PubMed [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Итоговый пакет атрибутивных данных сети исследуемых генов использовали для визуализации сети взаи-

Таблица 1. Характеристика исследованных групп

| Показатель                                    | ХОБЛ ( <i>n</i> = 92) | Контроль ( <i>n</i> = 81) | <i>P</i> |
|-----------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------|
| Возраст (среднее $\pm$ SD)                    | 58.49 $\pm$ 15.46     | 54.46 $\pm$ 14.43         | 0.27     |
| Женщины ( <i>n</i> , %)                       | 4 (4.35)              | 6 (7.41)                  | 0.259    |
| Мужчины ( <i>n</i> , %)                       | 88 (95.65)            | 75 (92.59)                |          |
| Некурящие ( <i>n</i> , %)                     | 12 (13.04)            | 11 (13.58)                | 0.891    |
| Курильщики ( <i>n</i> , %)                    | 80 (86.96)            | 70 (86.42)                |          |
| Индекс курения, пачки/лет (среднее $\pm$ SD)  | 39.37 $\pm$ 18.63     | 20.5 $\pm$ 15.1           | 0.0089   |
| ИМТ (среднее $\pm$ SD)                        | 25.48 $\pm$ 5.27      | 25.77 $\pm$ 4.31          | 0.702    |
| ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ (%) (среднее $\pm$ SD) | 61.64 $\pm$ 25.8      | 98.07 $\pm$ 22.26         | 0.0001   |
| ЖЕЛ (%) (среднее $\pm$ SD)                    | 57.94 $\pm$ 15.4      | 92.9 $\pm$ 21.83          | 0.5572   |
| ФЖЕЛ (среднее $\pm$ SD)                       | 45.01 $\pm$ 18.22     | 106.32 $\pm$ 31.14        | 0.0001   |
| ОФВ <sub>1</sub> (%) (среднее $\pm$ SD)       | 55.72 $\pm$ 23.63     | 69.78 $\pm$ 24.09         | 0.022    |

Примечание. ИМТ — индекс массы тела; ЖЕЛ — жизненная емкость легких; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; ОФВ<sub>1</sub> — объем форсированного выдоха за первую секунду; Индекс курения — число сигарет в день  $\times$   $\times$  на стаж курения (г) / 20.

модействия днРНК, микроРНК и мРНК на основе платформы Cytoscape 3.10.0.

**Выделение РНК из мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови.** Моноциты и лимфоциты периферической крови играют активную роль в патогенезе ХОБЛ, они участвуют в поддержании и контроле воспалительного процесса при ХОБЛ, поэтому уровень экспрессии днРНК и мРНК определяли в МНК. Особенности профиля экспрессии регуляторных некодирующих РНК и белоккодирующих генов в МНК больных ХОБЛ могут, по-видимому, служить неинвазивными биомаркерами заболевания.

Образцы периферической крови (4 мл) отбирали в вакуумные пробирки с EDTA K3 и в течение 1 ч доставляли в лабораторию. МНК выделяли стандартным методом плотностного центрифугирования в 3 мл раствора фикола (Ficoll-Paque GE, Cytiva плотность 1.077). Для этого 4 мл крови разбавляли равным объемом фосфатно-солевого буфера Дульбекко (однократный раствор DPBS без Ca и Mg, “БиолоТ”, Россия), затем наслаивали на 3 мл раствора фикола и центрифугировали при 420 *g* в течение 30 мин при комнатной температуре. Отбирали средний слой, содержащий МНК, который дважды промывали DPBS для удаления фикола и плазмы, после чего МНК переносили в другую пробирку и добавляли 1 мл TRIzol Reagent (“Thermo Fisher Scientific”, США) для выделения РНК. Суммарную РНК из МНК выделяли с использованием реактива TRIzol reagent (“Invitrogen”, США, www.invitrogen.com), согласно протоколу производителя. Каче-

ство и количество матрицы РНК (в нг/мкл) оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”) по поглощению при длине волны 260 нм. Качество РНК определяли по соотношению  $A_{260}/A_{280}$ , которое должно находиться в интервале 1.8–2.0. Для выявления компонентов, содержащих фенольные кольца, использовали также соотношение  $A_{260}/A_{230}$ . Целостность РНК оценивали с использованием электрофореза в 1%-ном агарозном геле с 0.5 мкг/мл бромистого этидия по полосам рРНК (28S и 18S). Все образцы РНК для удаления геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз (“Thermo Fisher Scientific”).

**Синтез кДНК и анализ экспрессии днРНК и мРНК.** кДНК синтезировали с помощью набора First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (“Thermo Fisher Scientific”) в соответствии с протоколом производителя с использованием гексамерного случайного праймера. Для синтеза кДНК матрицы РНК выравнивали до концентрации 100 нг/мкл, реакцию проводили в объеме 20 мкл в следующих условиях: матрица РНК — 3 мкл, случайный праймер — 1 мкл, 5 $\times$  реакционный буфер (250 мМ Трис-НCl pH 8.3, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ DTT) — 4 мкл, ингибитор РНКаз RiboLock (20 ед./мкл) — 1 мкл, 10 мМ смесь dNTP — 2 мкл, обратная транскриптаза RevertAid M-MuLV RT (200 ед./мкл) — 1 мкл, вода, свободная от нуклеаз, до объема 20 мкл. Затем смесь инкубировали при 25°C — 5 мин, 42°C — 60 мин, 70°C — 5 мин. Продукт ОТ-реакции хранили при –70°C до проведения количественной ПЦР. Количественную ПЦР проводили в 96-луночном планшете с использованием

qPCRmix-HS Master Mix (“Evrogen”, Россия, <https://evrogen.ru>) на приборе QuantStudio 5 (“Applied Biosystems”, США). По результатам биоинформатического поиска для анализа были выбраны следующие днРНК и белок-кодирующие гены: *TP53TG1*, *LINC00342*, *H19*, *MALAT1*, *DNM3OS*, *MEG3*, *PTEN*, *TGFB2*, *FOXO3*, *KEAP1*. Уровни экспрессии целевых генов определяли с использованием наборов ген-специфических праймеров (концентрация 10 нг/мкл) и флуоресцентных зондов (10 нг/мкл), дизайн и синтез которых осуществлен компанией “ДНК-Синтез” (Россия). В табл. 2 представлена характеристика выбранных генов. В качестве внутреннего контроля использовали ген домашнего хозяйства *B2M* (ID567). Уровень мРНК *B2M* определяли с помощью ген-специфичных праймеров и зонда (Hs00187842m1, “Thermo Fisher Scientific”). ОТ-ПЦР проводили в трех повторах

для каждого образца в следующих условиях: 3 мин при 95°C для начальной активации ПЦР, 15 с при 95°C – денатурация и амплификация в течение 1 мин при 60°C (45 циклов). Качество контролировали с использованием положительного (предоставлен разработчиком набора) и отрицательного контроля (не содержащего кДНК).

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 Software (GraphPad Software, <https://www.graphpad.com>) и IBM SPSS Статистика 22.0. Рассчитывали средние значения и стандартные отклонения (среднее  $\pm$  SD), медиану и 25–75% межквартильный размах (медиана 25–75% IQR), группы сравнивали с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни (если распределение данных отличалось от нормального) или теста Стьюдента (для данных с нормальным

**Таблица 2.** Гены, праймеры и зонды, использованные в работе

| Ген (ID)*                       | Локализация | Нуклеотидная последовательность праймеров и зонда (5'→3')                                                                                    |
|---------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>TP53TG1</i><br>(ID:11257)    | 7q21.12     | TP53TG1-F – GGCTCTTTCCTTTAATCTTCGG<br>TP53TG1-R – GAATTGTTACCAGGGTACTCAGAC<br>TP53TG1-Probe –<br>FAM-TGCCCAACTCAGGTTTAACCACCA-BHQ1           |
| <i>LINC00342</i><br>(ID:150759) | 2q11.1      | LINC00342-F – TTTCATCTGAAGCAGCAGAGTG<br>LINC00342-R – CAGTTGTGGTGATCTTTGTTTCCTG<br>LINC00342-Probe –<br>FAM-CAGAGTCAGGTCACCAACCAGTGTGGA-BHQ1 |
| <i>H19</i><br>(ID:283120)       | 11p15.5     | H19-F – GAATCGGCTCTGGAAGGTGA<br>H19-R – GCTGCTGTTCCGATGGTG<br>H19-Probe – FAM-CCAGACCTCATCAGCCCAACATC-BHQ1                                   |
| <i>MALAT1</i><br>(ID:378938)    | 11q13.1     | MALAT1-F – GAACACAAGAAGTGCTTTAAGAGGC<br>MALAT1-R – GCGAGGCGTATTTATAGACGG<br>MALAT1-Probe – FAM-AGGTGATCGAATTCCGGTGATGC-BHQ1                  |
| <i>DNM3OS</i><br>(ID:100628315) | 1q24.3      | DNM3OS-F – GGGACACTGCTGAGAAAAGACTG<br>DNM3OS-R – GCTCACTGTTGGTTAGTTTCCTC<br>DNM3OS-Probe – FAM-ATCCCCGCTGGTCTTCCCTTCG-BHQ1                   |
| <i>MEG3</i><br>(ID:55384)       | 14q32.2     | MEG3-F – GCCCATCTACACCTCACGAG<br>MEG3-R – CCTCTTCATCCTTTGCCATCC<br>MEG3-Probe –<br>FAM-CCCACCAACATACAAAGCAGCCACT-BHQ1                        |
| <i>PTEN</i><br>(ID: 5728)       | 10q23.31    | PTEN-F – CACACGACGGGAAGACAAGT<br>PTEN-R – CCTCTGGTCCTGGTATGAAGAA<br>PTEN-Probe – FAM-CCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTG-BHQ1                            |
| <i>TGFB2</i><br>(ID: 7042)      | 1q41        | TGFB2-F – TGCCGCCCTTCTTCCC<br>TGFB2-R – CATTCTTCTCCATTGCTGAGAC<br>TGFB2-probe – FAM-CCATCCCGCCCACTTTCTACAGAC-BHQ1                            |
| <i>FOXO3</i><br>(ID: 2309)      | 6q21        | FOXO3-F – GGGAAAGTGGGCAAAGCAGA<br>FOXO3-R – GCGTGGGATTACAAAGG<br>FOXO3-probe – FAM-ACCCTTTGCCAAATCTGCTCTC-BHQ1                               |
| <i>KEAP1</i><br>(ID: 9817)      | 19p13.2     | KEAP1-F – CAACAGTGTGGAGAGGTATGAGC<br>KEAP1-R – AAGGAGACGATTGAGGACAGC<br>KEAP1-probe – FAM-CCCCAATGCTGACACGAAGGATC-BHQ1                       |

\* ID гена приведены согласно базе данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

распределением). Частоты качественных признаков сравнивали с помощью теста  $\chi^2$ . Уровень  $P < 0.05$  считали статистически значимым. Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью метода  $\Delta\Delta Ct$ , который основан на предположении, что разница в пороге цикла ( $\Delta Ct$ ) между целевым и референсным генами пропорциональна относительной экспрессии целевого гена; результаты нормировали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *B2M* и соответствующих генов по следующей схеме  $\Delta Ct = Ct$  (целевой ген) –  $Ct$  (ген домашнего хозяйства) [34]. Относительный уровень экспрессии каждого гена представлен в виде  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  [34]. Различия в уровне относительной экспрессии в группе больных и в контроле рассчитывали с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни. Оценивали кратность изменения экспрессии у больных по сравнению с контролем (Fold Change)  $(2^{(-\Delta\Delta Ct)} \text{ ХОБЛ} / 2^{(-\Delta\Delta Ct)} \text{ контроль})$  и кратность снижения или увеличения уровня экспрессии у больных (Fold Regulation), при этом для величин Fold Change  $< 1$  Fold Regulation =  $(-1 / \text{Fold Change})$ . Корреляцию между переменными определяли с помощью непараметрического анализа с вычислением коэффициента корреляции Спирмена. Прогностическую значимость оценивали с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic analysis), с вычислением площади под кривой (AUC – area under the curve) с расчетом чувствительности и специфичности. Наиболее значимые модели идентифицировали с использованием множественного регрессионного анализа с пошаговым включением значимых предикторов с последующим ROC-анализом для оценки эффективности прогностической модели.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ сети взаимодействующих мРНК, микроРНК и днРНК*

Для идентификации сети взаимодействующих мРНК, микроРНК и днРНК нами проведен предварительный анализ *in silico*. В табл. 3 представлены функциональные характеристики днРНК и мРНК, выбранных для исследования. Визуализация сети взаимодействующих некодирующих РНК (днРНК и микроРНК) и мРНК представлена на рис. S1 (Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Markelov\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Markelov_rus.zip)).

Проведенный нами анализ *in silico* включал комплексное использование нескольких прогностических онлайн-инструментов. Особое значение в данном контексте играют параметры сайтов связывания корегулируемых РНК, в частности

такие, как энергия связывания. Предполагается, что этот параметр зависит от размера участка связывания [35]. В свою очередь, некодирующие РНК связываются предпочтительно с высокоаффинными последовательностями длиной 8, 7 нуклеотидов, а также (несколько слабее) с последовательностями из 6 нуклеотидов [36–38]. В соответствии с этим большинство сайтов связывания, предсказанных нами в результате анализа *in silico*, обладают высокой аффинностью. Обилие отдельных генов-мишеней способно модулировать активность некодирующих РНК. Это обуславливает возможность существования чувствительного порога концентрации эффекторной некодирующей РНК и целевых транскриптов [35]. Целевые транскрипты для их эффективного взаимодействия с некодирующей РНК должны экспрессироваться на сверхвысоком уровне, превышающем физиологически нормальный [39].

Функциональная характеристика сети днРНК TP53TG1 ограничивается проапоптотическим и антифибротическим потенциалом [40, 41].

Направление целевых взаимодействий днРНК LINC00342, связано с усилением ЭМП и воспалительного процесса [42–44].

Сеть функциональных взаимодействий днРНК H19 характеризуется проапоптотической и профибротической осями, связана с усилением воспаления в легочной ткани, а также ЭМП [22, 23, 45], а днРНК MALAT1 в основном связана с ЭМП. Так, взаимодействие MALAT1 с рядом микроРНК приводит к усилению ЭМП и активации сигнального каскада АКТ/mTOR [46–49]. MALAT1 вызывает профибротический и проэмфизематозный эффекты [50], усиливает воспалительные процессы в легких [21] (табл. 3).

ДнРНК MEG3 активирует сигнальные каскады TGF- $\beta$ /SMAD3 [51] и Wnt, участвует в регуляции ЭМП [52]. MEG3 действует как регулятор апоптоза в клетках легкого, связывание этой днРНК с miR-181a приводит к активации BCL2 [53]. Сеть взаимодействий MEG3 содержит несколько молекул, играющих важную роль в патогенезе ХОБЛ. MEG3 способна ингибировать функцию miR-181a-5p с последующей стимуляцией сигнального каскада PTEN/pSTAT5/SOCS1 в макрофагах при остром респираторном дистресс-синдроме [54]. По аналогичному принципу MEG3 взаимодействует с miR-181b-5p, которая модулирует сигнальный каскад JAK2/STAT3, регулируя таким образом поляризацию макрофагов к M2-подобному фенотипу. MEG3 может предотвратить данный эффект и потенциально активировать провоспалительный фенотип макрофагов [55]. Проэмфизематозная ось содержит всего одну целевую молекулу, miR-181b-3p, которая связана с пато-

Таблица 3. Функциональная характеристика исследованных днРНК и мРНК

| Ген              | Мишень                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Функция                                                                                                                                       |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>TP53TG1</i>   | miR-18a-5p, ACTA2, FN1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Проапоптотическое действие на клетки легкого, антифибротическое действие                                                                      |
| <i>LINC00342</i> | miR-15b/TPBG, miR-15b/BCL2, miR-203a-3p/SIX1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Регуляция ЭМП, усиление воспалительного процесса в легких                                                                                     |
| <i>H19</i>       | miR-29b, miR-29a-3p, miR-196a, miR-140, miR-21/PTEN/AKT, miR-122-5p, miR-675-3p/IGF1R, miR-200a, miR-19b-3p/FTH1, miR-130a-3p/WNK3, miR-193a-3p, miR-138                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Профибротический эффект, усиление воспалительного процесса в легком, проапоптотическое действие, усиление ЭМП                                 |
| <i>MALAT1</i>    | miR-101-3p/MCL1, miR-101/SOX9 (путь Wnt), miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-206 (путь Akt/mTOR), miR-202-3p/RRM2, miR-202-3p/CCND1, miR-129-5p/YWHAB, miR-129-5p/MCRS1, miR-129-5p/CDH1, miR-129-5p/VIM, miR-129-5p/HMGB1, miR-374b-5p/SRSF7, miR-374b-5p/FOXP1, miR-613, miR-613/COMMD8, miR-613/GJA1, miR-613/CDK4, miR-19b-3p/PPP2R5E, miR-19b-3p/BCL2L11, miR-17-5p/FOXA, miR-1297/TRIB2, miR-375/YAP, miR-194-5p/FOXP2, miR-194-5p/FOXK1, miR-503-5p, miR-590, miR-590/YAP1, miR-150/eIF4E/Akt, miR-22-3p/NLRP3, miR-375, miR-23c, miR-429 | Антиапоптотическое действие, профибротический эффект, усиление ЭМП, усиление воспалительного процесса в легких, проэмфизематозный эффект      |
| <i>DNM3OS</i>    | Предшественник miR199a-5p/3p, miR-214-3p; miR-204-5p/APIS2, miR-199a-5p/3p/SIRT1, miR-181a-5p/STAT3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Профибротический эффект                                                                                                                       |
| <i>MEG3</i>      | miR-181a-5p/Bcl-2, miR-181a-5p/PTEN, miR-181d-5p/CDKN3, miR-181a-5p/PTEN/pSTAT5/SOCS1, miR-181b-5p/JAK2/STAT3, miR-181b-3p, miR-140-5p*/TLR4, miR-140-5p/MMD, miR-140-5p/YES1, miR-140-5p (путь Wnt) miR-125a-5p, miR-125a-5p/STAT3, miR-125a-5p/Sp1/SIRT1/HIF-1 $\alpha$ , MDM2, TP53, TP63, KRT14, STAT3, YAP1, TP73, SOX2, HES1, HEY1 AXL, MDM2, JARID2, EZH2; miR-133a-3p/IGF1R (путь TGF- $\beta$ /Smad3), miR-133a-3p/SIRT1, miR-770-5p/TGFBR1, miR-664a-3p/FHL1                                                                                   | Антиапоптотическое действие, усиление ЭМП, усиление воспалительного процесса в легких, проэмфизематозный эффект, усиление клеточного старения |
| <i>TGFB2</i>     | miR-454-3p, miR-193a-3p                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Усиление ЭМП, антиапоптотический эффект                                                                                                       |
| <i>PTEN</i>      | miR-19b-3p, miR-23a-3p, miR-217-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-486-5p, miR-425-5p, miR-18a-5p, miR-543, miR-20b-5p, miR-21, miR-216a, miR-181a-5p                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Антиапоптотический эффект, профибротический эффект, регуляция ЭМП                                                                             |
| <i>FOXO3</i>     | miR-182, miR-217, miR-29b-3p, miR-23a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Антиапоптотический эффект проапоптотический эффект                                                                                            |
| <i>KEAP1</i>     | miR-421 miR-432-3p, MALAT1, miR-125b-5p, miR-141-3p                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Антиапоптотический эффект регулятор антиоксидантной защиты клетки                                                                             |

Примечание. Взаимодействие днРНК-микроРНК с мРНК анализировали с использованием онлайн-инструмента NetworkAnalyst 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca/NetworkAnalyst/>) и интегрированных баз KEGG, miRTarBase v8.0 и TarBase v8.0; онлайн-инструмента Lncrna2target V3.0 (<http://bio-annotation.cn/lncrna2target/browse.jsp>) и NCBI PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

логическим ангиогенезом в легких и тем самым с инициацией эмфиземы [50]. Связывая miR-125a-5p и регулируя таким образом сигнальный каскад Sp1/SIRT1/HIF-1 $\alpha$ , MEG3 может замедлять старение клеток легочного эпителия [56].

ДнРНК DNМ3ОS взаимодействует с молекулами, связанными с профибротическими и провоспалительными эффектами; так, DNМ3ОS участвует в регуляции TGF- $\beta$ -индуцированной активации миофибробластов легкого [20]. Согласно результатам анализа *in silico*, miR-181a-5p является мишенью для DNМ3ОS. В свою очередь, противовоспалительное действие miR-181a-5p связано с его способностью регулировать сигнальный каскад PTEN-pSTAT5-SOCS1 [54].

В список генов, отобранных для исследования, входят также белоккодирующие гены. Дополнительно на рис. S2 (см. электронное приложение) приведена сеть белок-белковых взаимодействий продуктов исследованных генов. В данной сети можно выделить три массивных кластера белок-белковых взаимодействий, образуемых KEAP1, PTEN и FOXO3, а также малый кластер, формируемый на базе TGFB2.

Взаимодействие PTEN с микроРНК (miR-19b-3p, miR-23a-3p, miR-486-5p и др.) приводит к снижению уровня PTEN в результате активации сигнального каскада PI3K/AKT, а также к снижению апоптоза клеток [57]. MiR-181a-5p, связываясь с PTEN, стимулирует ЭМП клеток аденокарциномы легкого [58]. Функциональная сеть, связанная с фиброзом, содержит две микроРНК: miR-21 и miR-216a, которые, связываясь с PTEN, модулируют пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток дыхательных путей с последующей их гиперплазией и способностью к формированию фенотипа ЭМП [45]. Для ХОБЛ характерны эмфизематозные изменения дыхательных путей; в данном контексте выделяется взаимодействие PTEN с N-концевым доменом фактора SRF (serum response factor), что способствует транскрипционной активности SRF и нормальной пролиферации гладкомышечных клеток сосудов [59].

Сеть целевых молекул белоккодирующего гена FOXO3 связана апоптозом. Так, связывание FOXO3 с miR-182 приводит к устойчивости клеток немелкоклеточного рака легкого к апоптозу, индуцированному лучевой терапией [60]. При связывании FOXO3 с miR-23a, напротив, наблюдается снижение пролиферативных способностей и задержка прохождения клеточного цикла фибробластами легкого [61]. Взаимодействие FOXO3 с SIRT1 приводит к формированию

ответа на антиоксиданты; деацетилирование FOXO3 усиливает убиквитинирование и деградацию FOXO3 в ответ на окислительный стресс, что способствует выживаемости эндотелиальных клеток-предшественников на фоне окислительного стресса [62].

С 3'-нетранслируемой областью KEAP1 прямо связывается miR-141-3p, усиливая таким образом апоптоз гладкомышечных клеток сосудов [63]. IKBKB (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta), активирующий ядерный фактор NF- $\kappa$ B (ключевой регулятор воспалительного ответа), способен связываться с KEAP1 в составе комплекса KEAP1-CUL3-RBX1, что приводит к деградации IKBKB и снижает активацию NF- $\kappa$ B, способствуя снижению воспалительного ответа [64].

TGFB2 вовлечен в регуляцию ЭМП, в сеть его взаимодействий входит miR-454-3p, которая связывается с TGFB2 и снижает таким образом ЭМП [65]. Также можно выделить функцию, связанную с регуляцией апоптоза, в которой взаимодействие miR-193a-3p с TGFB2 противодействует ферроптозу [66]. Белок-белковые взаимодействия TGFB2 представлены в основном сетью, связанной с регуляцией фиброза. В миофибробластах белок NREP (neuronal regeneration related protein) связывается с TGFB2 и подавляет экспрессию коллагенов типа 1 и 3, что снижает интенсивность фиброзного перерождения клеток [67]. Напротив, CTGF (connective tissue growth factor) напрямую связывается с TGFB2 и способствует профибротической активности TGFB2 [68]. Взаимодействие TGFB2 с его рецептором 2 (TGFB2R2) приводит к активации ЭМП [69].

Таким образом, согласно результатам *in silico* анализа, выбранные нами днРНК и мРНК функционально действуют как регуляторы сигнальных каскадов TGF- $\beta$ /SMAD3, Wnt, PI3K/AKT и Keap1/Nrf2, вовлеченных в такие важные клеточные процессы, как антиоксидантный ответ на окислительный стресс, апоптоз, воспаление, фиброгенез, ЭМП и клеточное старение.

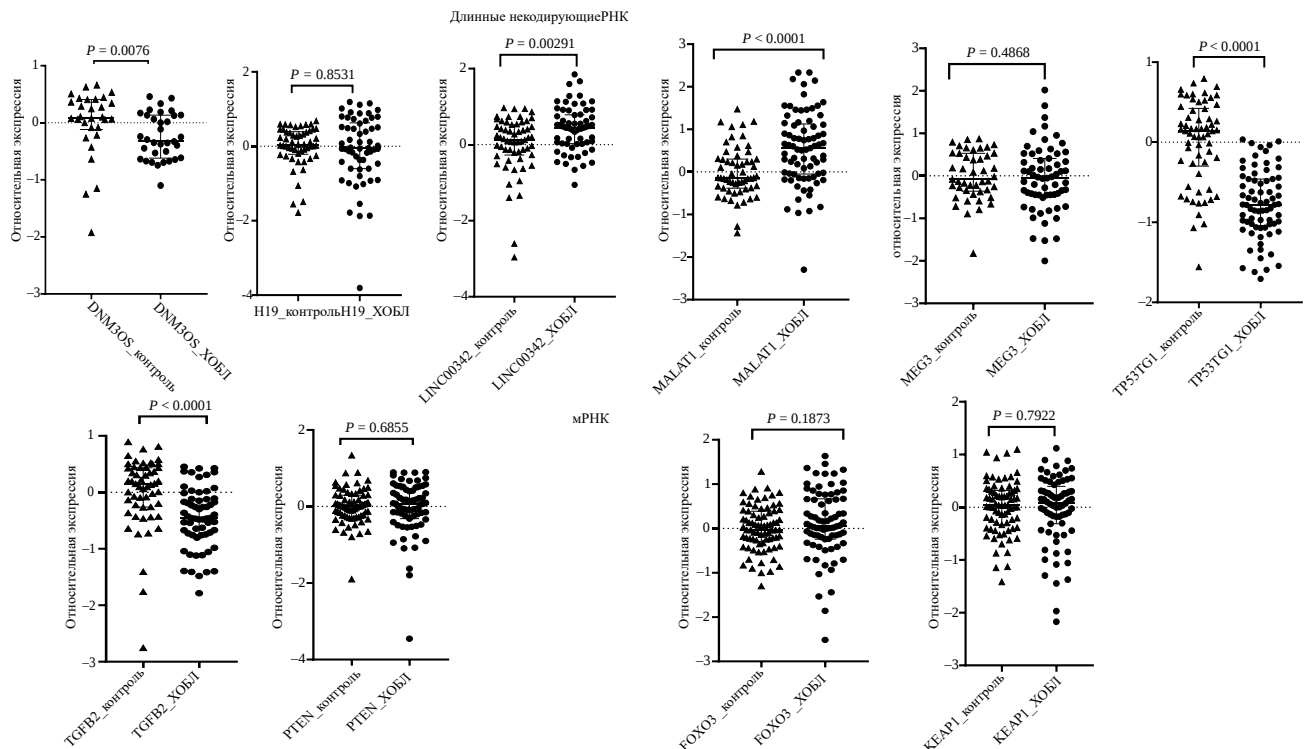
#### *Анализ относительного уровня экспрессии днРНК и мРНК у больных ХОБЛ*

Нами определен уровень относительной экспрессии днРНК (TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNМ3ОS, MEG3) и мРНК (PTEN, TGFB2, FOXO3, KEAP1) в МНК больных ХОБЛ и здоровых индивидов. Результаты представлены в табл. 4 и на рис. 1.

**Таблица 4.** Уровень относительной экспрессии исследованных генов у больных ХОБЛ

| Ген              | Кратность изменения экспрессии | Кратность снижения / повышения уровня экспрессии | <i>P</i> |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------|----------|
| <i>TP53TG1</i>   | 0.1532                         | −6.5244                                          | 0.0001   |
| <i>LINC00342</i> | 2.874                          | 2.874                                            | 0.0029   |
| <i>MALAT1</i>    | 6.983                          | 6.983                                            | 0.0001   |
| <i>H19</i>       | 1.764                          | 1.764                                            | 0.8531   |
| <i>DNM3OS</i>    | 0.5176                         | −1.9317                                          | 0.0076   |
| <i>MEG3</i>      | 2.304                          | 2.304                                            | 0.4868   |
| <i>PTEN</i>      | 1.087                          | 1.087                                            | 0.6855   |
| <i>TGFB2</i>     | 0.3639                         | −2.7476                                          | 0.0001   |
| <i>FOXO3</i>     | 2.246                          | 2.246                                            | 0.1873   |
| <i>KEAP1</i>     | 1.0513                         | 1.0513                                           | 0.7922   |

Примечание. Кратность изменения экспрессии (Fold Change) =  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  ХОБЛ /  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  контроль; кратность снижения / повышения экспрессии у больных (Fold Regulation) для величин Fold Change < 1, Fold Regulation = (−1/ Fold Change); *P*, значимость для U-теста Манна–Уитни.



**Рис. 1.** Относительная экспрессия (представлена в виде  $\lg$  Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )) днРНК и мРНК у больных ХОБЛ и индивидов контрольной группы. Результаты представлены в виде медианы и 25–75% межквартильного интервала (медиана (25–75% IQR), *P* – в U-тесте Манна–Уитни).

Установлено значимое, более чем в 6 раз, снижение уровня днРНК *TP53TG1* у больных ХОБЛ (Fold Change (FCh) = 0.1532, Fold Regulation (FR) = −6.5244, *P* = 0.0001) (табл. 4). При этом в группе больных ХОБЛ выявлено значимое повышение экспрессии днРНК *MALAT1* (FCh = 6.983, *P* = 0.0001). Уровень днРНК *LINC00342* у больных ХОБЛ был почти в 3 раза выше, чем у здоровых индивидов (FCh = 2.874, *P* = 0.0029). Нами показано значимое снижение экспрес-

сии днРНК *DNM3OS* у больных ХОБЛ (FCh = 0.5176, FR = −1.9317, *P* = 0.0076). В МНК больных ХОБЛ уровень экспрессии мРНК *TGFB2* был значимо ниже, чем у здоровых индивидов (FCh = 0.3639, FR = −2.7476, *P* = 0.0001).

Уровни экспрессии днРНК *H19* и мРНК *PTEN* и *KEAP1* в МНК больных ХОБЛ были сопоставимы с уровнями в контрольной группе. Выявлено увеличение относительного уров-

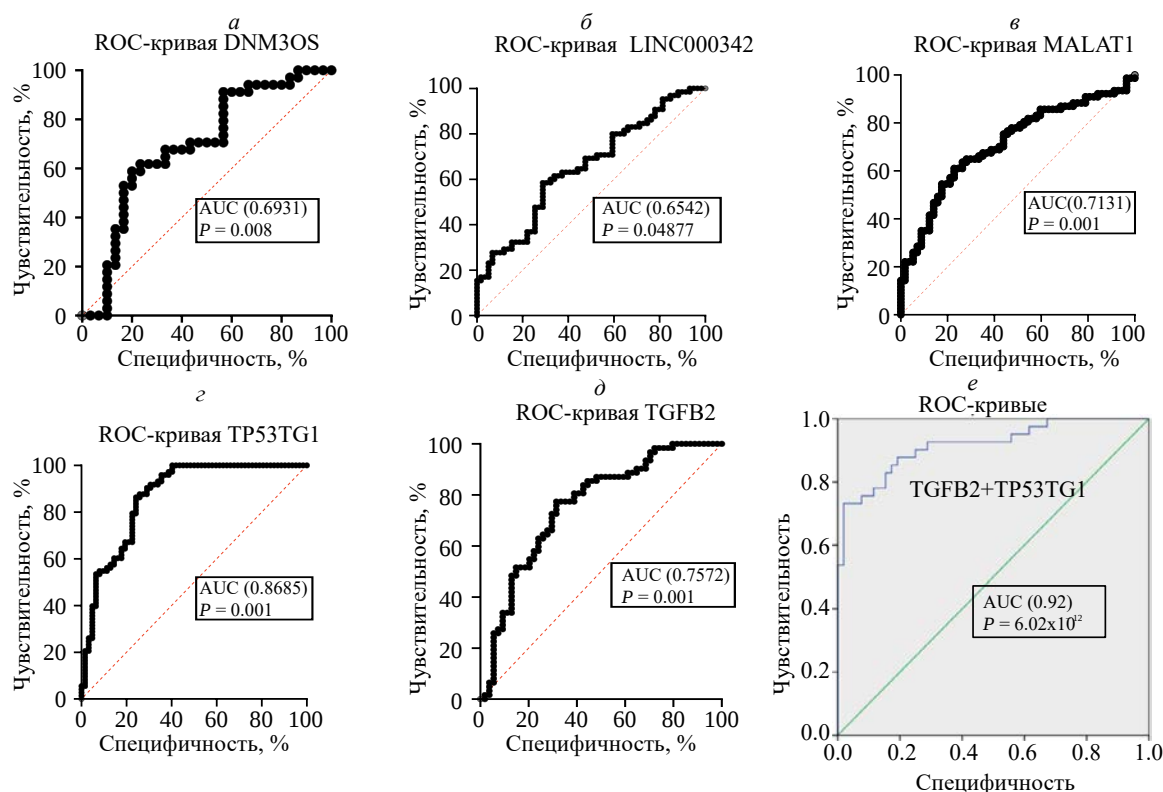
ня экспрессии днРНК MEG3 и мРНК FOXO3 у больных ХОБЛ более чем в 2 раза, однако различия не достигали статистически значимого уровня.

Таким образом, обнаружены различия в уровне днРНК TP53TG1, LINC00342, DNM3OS и MALAT1 и мРНК TGFB2 в МНК больных ХОБЛ и в контрольной группе, то есть эти днРНК и мРНК можно отнести к дифференциально экспрессируемым в МНК при ХОБЛ. Уровни экспрессии днРНК TP53TG1, LINC00342 и DNM3OS в МНК больных ХОБЛ определены впервые.

### *Оценка прогностической значимости дифференциальной экспрессии днРНК и мРНК в развитии ХОБЛ*

На начальных этапах ХОБЛ протекает без выраженных симптомов, постепенно снижается функция легочного дыхания, жизненная емкость легких. Первичный диагноз устанавливается уже при наличии значимых эмфизематозных изменений легочной ткани, обструкции мелких дыхательных путей, которые приводят к нарастанию одышки, неэффективности про-

водимой терапии и резкому падению качества жизни [1, 2]. Поэтому для ранней диагностики ХОБЛ и выявления предрасположенности к быстрому прогрессированию заболевания актуальным представляется поиск биомаркеров ХОБЛ. Прогностическую значимость изменения уровней экспрессии днРНК (TP53TG1, LINC00342, MALAT1, DNM3OS) и мРНК (TGFB2) при ХОБЛ оценивали с помощью ROC-анализа (рис. 2). Определение относительного уровня экспрессии днРНК TP53TG1 позволяет с умеренной прогностической значимостью дифференцировать больных ХОБЛ от контрольных лиц с AUC = 0.8685 (95% CI 0.8062–0.9309,  $P = 0.001$ , оптимальная точка отсечения 0.6312, чувствительность = 0.9041, специфичность = 0.7097). Использование ROC-анализа показало умеренную прогностическую значимость оценки уровня TGFB2 AUC = 0.75735 (95% CI 0.6678–0.8466,  $P = 0.001$ , оптимальная точка отсечения 0.7923, чувствительность = 0.7742, специфичность = 0.6850), днРНК MALAT1 AUC = 0.7131 (95% CI 0.6261–0.8002,  $P = 0.001$ , оптимальная точка отсечения 1.956, чувствительность = 0.6234, специфичность = 0.7368), днРНК LINC00342 AUC = 0.6542 (95% CI 0.5586–0.7498,  $P = 0.0487$ , оптимальная точка отсечения 2.364,



**Рис. 2.** ROC-анализ прогностической значимости днРНК и мРНК, относительный уровень экспрессии которых изменен в МНК больных ХОБЛ. AUC: площадь под кривой. *а* – днРНК DNM3OS; *б* – днРНК LINC00342; *в* – днРНК MALAT1; *г* – днРНК TP53TG1; *д* – мРНК TGFB2; *е* – прогностическая модель, которая включает одновременную оценку уровня экспрессии днРНК TP53TG1 и TGFB2.

чувствительность = 0.6154, специфичность = 0.661) и днРНК DNM3OS AUC = 0.6931 (95% CI 0.5589–0.8274,  $P = 0.008$ , оптимальная точка отсечения 0.7968, чувствительность = 0.6178, специфичность = 0.7667) для дифференциации больных ХОБЛ от здоровых индивидов.

По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа получена высокоинформативная прогностическая модель развития ХОБЛ, которая включает одновременную оценку уровня экспрессии днРНК TP53TG1 и мРНК TGFB2 в МНК (табл. 5). Модель имеет высокую предсказательную способность (AUC = 0.92, 95% CI 0.86–0.98, чувствительность – 73.2%, специфичность – 92.3%) (рис. 2) и позволяет правильно отличить индивидов с ХОБЛ и без нее.

Согласно результатам ROC-анализа, самую высокую прогностическую значимость для дискриминации больных ХОБЛ и здоровых индивидов имеет уровень экспрессии днРНК TP53TG1, а также совместный уровень экспрессии данной днРНК и мРНК TGFB2.

#### Корреляционный анализ

С учетом тесного функционального взаимодействия выбранных нами днРНК и мРНК определяли корреляцию (коэффициент корреляции Спирмена  $r$ , уровень значимости  $P$ ) между уровнями экспрессии всех изученных генов (табл. 6). Выявлена положительная корреляция между относительным уровнем экспрессии DNM3OS и H19 ( $r = 0.307$ ,  $P = 0.029$ ), MEG3 ( $r = 0.518$ ,  $P = 5.81 \times 10^{-5}$ ), TP53TG1 ( $r = 0.345$ ,  $P = 0.0078$ ) и отрицательная – между DNM3OS и MALAT1 ( $r = -0.284$ ,  $P = 0.043$ ). При этом уровень экспрессии MALAT1 положительно коррелировал с уровнями LINC00342 ( $r = 0.513$ ,  $P = 3.3 \times 10^{-9}$ ) и генами PTEN ( $r = 0.435$ ,  $P = 1.13 \times 10^{-6}$ ), FOXO3 ( $r = 0.259$ ,  $P = 0.003$ ). Уровень экспрессии днРНК TP53TG1 положительно коррелировал с уровнями MEG3 ( $r = 0.240$ ,  $P = 0.019$ ) и TGFB2 ( $r = 0.242$ ,  $P = 0.019$ ).

Положительной была корреляция экспрессии генов TGFB2 и KEAP1 ( $r = 0.249$ ,  $P = 0.012$ ), гена KEAP1 – с геном FOXO3 ( $r = 0.318$ ,  $P = 0.0001$ ). Выявлена выраженная положительная корреляция между уровнями экспрессии генов FOXO3 и PTEN ( $r = 0.52$ ,  $P = 7.21 \times 10^{-11}$ ).

С целью оценки вклада исследованных днРНК и мРНК в прогрессирование и раннее развитие ХОБЛ проведен анализ возможной корреляции с клиническо-демографическими параметрами (табл. 7). Показана отрицательная корреляция между возрастом больных ХОБЛ и уровнями экспрессии MALAT1 ( $r = -0.313$ ,  $P = 0.007$ ), TGFB2 ( $r = -0.351$ ,  $P = 0.006$ ), FOXO3 ( $r = -0.295$ ,  $P = 0.012$ ) и KEAP1 ( $r = -0.338$ ,  $P = 0.005$ ). Наибольший интерес представляет анализ корреляции уровня экспрессии с параметрами функции легочного дыхания, непосредственно отражающими прогрессирование обструкции дыхательных путей у больных ХОБЛ и тяжесть заболевания. Так, выявлена положительная корреляция показателя ОФВ1/ФЖЕЛ и MALAT1 ( $r = 0.272$ ,  $P = 0.03$ ), TGFB2 ( $r = 0.338$ ,  $P = 0.01$ ), FOXO3 ( $r = 0.426$ ,  $P = 0.0004$ ), KEAP1 ( $r = 0.311$ ,  $P = 0.014$ ). Уровень экспрессии FOXO3 коррелировал с показателем ОФВ1 ( $r = 0.385$ ,  $P = 0.0018$ ), а DNM3OS с ФЖЕЛ ( $r = 0.426$ ,  $P = 0.037$ ).

Выявленная корреляция между уровнями экспрессии днРНК MALAT1, DNM3OS и мРНК TGFB2, FOXO3, KEAP1 и показателями функции легочного дыхания указывает на вклад этих РНК не только в развитие ХОБЛ, но и на непосредственное участие в процессах старения легочной ткани, выражающееся в постепенном снижении проводимости воздухоносных путей, развитии фиброзных и эмфизематозных изменений.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что высокий уровень экспрессии днРНК MALAT1 в МНК связан

**Таблица 5.** Предиктивная регрессионная модель развития ХОБЛ

| Предиктор                                                                                                    | Коэффициент $\beta$ | $P_{\text{Wald}}$    | OR     | 95%CI      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------|------------|
| Относительная экспрессия TGFB2                                                                               | 0.898               | 0.004                | 2.456  | 1.33–4.54  |
| Относительная экспрессия TP53TG1                                                                             | 3.365               | $6.9 \times 10^{-5}$ | 28.939 | 5.52–151.8 |
| Константа регрессии                                                                                          | –3.032              | 0.000                | 0.048  |            |
| $P = 6.02 \times 10^{-12}$ ,<br>AUC = 0.92 (95%CI 0.86–0.98),<br>Чувствительность 73.2%, Специфичность 92.3% |                     |                      |        |            |

Примечание.  $P_{\text{Wald}}$  – значимость в статистике Вальда (Wald test); OR – exp ( $\beta$ ) отношение шансов;  $P$  – значение в тесте отношения правдоподобия; AUC – площадь под кривой; 95%CI – асимптотический 95% доверительный интервал для AUC. ROC-кривая представлена на рис. 2.

**Таблица 6.** Анализ корреляции между уровнями экспрессии генов днРНК и мРНК (коэффициент корреляции Спирмена *r*; уровень значимости *r*, уровень значимости *P*)

| Ген              | <i>DNM3OS</i>                           | <i>H19</i>      | <i>LINC00342</i>                       | <i>MALAT1</i>                           | <i>MEG3</i>     | <i>TP53TG1</i>  | <i>TGFB2</i>    | <i>PTEN</i>                              | <i>FOXO3</i>    |
|------------------|-----------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------------------|-----------------|
| <i>H19</i>       | 0.307275                                |                 |                                        |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
|                  | 0.02996                                 |                 |                                        |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
| <i>LINC00342</i> | −0.00812                                | −0.02958        |                                        |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
|                  | 0.955395                                | 0.772508        |                                        |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
| <i>MALAT1</i>    | <b>−0.28443</b>                         | 0.085894        | <b>0.513173</b>                        |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
|                  | <b>0.043083</b>                         | 0.393072        | <b><math>3.3 \times 10^{-9}</math></b> |                                         |                 |                 |                 |                                          |                 |
| <i>MEG3</i>      | 0.518963                                | 0.348803        | 0.159364                               | 0.174391                                |                 |                 |                 |                                          |                 |
|                  | <b><math>5.81 \times 10^{-5}</math></b> | <b>0.001416</b> | 0.138051                               | 0.098274                                |                 |                 |                 |                                          |                 |
| <i>TP53TG1</i>   | 0.345597                                | −0.00027        | 0.143321                               | −0.10556                                | <b>0.240212</b> |                 |                 |                                          |                 |
|                  | <b>0.007881</b>                         | 0.997961        | 0.138938                               | 0.261518                                | <b>0.019699</b> |                 |                 |                                          |                 |
| <i>TGFB2</i>     | 0.247449                                | 0.138947        | −0.05147                               | −0.01982                                | 0.210362        | <b>0.242294</b> |                 |                                          |                 |
|                  | 0.086492                                | 0.234485        | 0.644021                               | 0.856252                                | 0.068157        | <b>0.019699</b> |                 |                                          |                 |
| <i>PTEN</i>      | −0.07192                                | −0.07884        | 0.158737                               | <b>0.435793</b>                         | 0.035683        | −0.10639        | 0.096514        |                                          |                 |
|                  | 0.63092                                 | 0.452538        | 0.10411                                | <b><math>1.13 \times 10^{-6}</math></b> | 0.748773        | 0.268627        | 0.339459        |                                          |                 |
| <i>FOXO3</i>     | −0.0781                                 | −0.0428         | 0.122231                               | <b>0.259988</b>                         | 0.061188        | −0.1748         | 0.184983        | <b>0.520288</b>                          |                 |
|                  | 0.585927                                | 0.666151        | 0.191171                               | <b>0.003411</b>                         | 0.564501        | 0.060558        | 0.061396        | <b><math>7.21 \times 10^{-11}</math></b> |                 |
| <i>KEAP1</i>     | −0.15095                                | 0.159005        | −0.01331                               | 0.113786                                | 0.090052        | −0.05824        | <b>0.249805</b> | −0.01431                                 | <b>0.317967</b> |
|                  | 0.290352                                | 0.119796        | 0.888743                               | 0.215925                                | 0.406826        | 0.541892        | <b>0.012193</b> | 0.871115                                 | 0.000115        |

Примечание. Здесь и в табл. 7 жирным выделены статистически значимые результаты.

**Таблица 7.** Анализ корреляций между уровнем экспрессии исследованных генов и клиническими параметрами

| Параметр       | <i>DNM3OS</i>  | <i>H19</i> | <i>LINC00342</i> | <i>MALAT1</i>  | <i>MEG3</i> | <i>TP53TG1</i> | <i>TGFB2</i>   | <i>PTEN</i> | <i>FOXO3</i>   | <i>KEAP1</i>   |
|----------------|----------------|------------|------------------|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|
| Возраст        | −0.1259        | −0.0918    | −0.2058          | <b>−0.313</b>  | −0.1383     | 0.12348        | <b>−0.3514</b> | −0.1809     | <b>−0.2951</b> | <b>−0.3382</b> |
|                | 0.47809        | 0.50484    | 0.11459          | <b>0.00742</b> | 0.29615     | 0.3085         | <b>0.00591</b> | 0.14612     | <b>0.01249</b> | <b>0.00513</b> |
| ИМТ            | 0.24633        | 0.01465    | −0.1185          | <b>−0.3376</b> | −0.0428     | −0.0797        | −0.0358        | −0.1114     | −0.024         | 0.10606        |
|                | 0.16021        | 0.91547    | 0.36724          | <b>0.00372</b> | 0.74731     | 0.51201        | 0.78618        | 0.37305     | 0.84223        | 0.39299        |
| Индекс курения | −0.193         | 0.04926    | −0.2233          | −0.1945        | 0.07943     | 0.15721        | −0.1431        | −0.0886     | −0.1508        | −0.1228        |
|                | 0.27418        | 0.72095    | 0.08629          | 0.10155        | 0.54981     | 0.19368        | 0.27536        | 0.47908     | 0.2093         | 0.32233        |
| ОФВ1/ФЖЕЛ, %   | −0.0988        | −0.0678    | 0.23456          | <b>0.27201</b> | 0.15151     | 0.0407         | <b>0.33801</b> | 0.11216     | <b>0.42629</b> | <b>0.31171</b> |
|                | 0.60347        | 0.65079    | 0.09418          | <b>0.03104</b> | 0.27411     | 0.74753        | <b>0.01161</b> | 0.39769     | <b>0.00049</b> | 0.01447        |
| ЖЕЛ, %         | 0.21965        | −0.0207    | 0.2071           | 0.10873        | 0.10165     | −0.0575        | 0.06387        | −0.065      | 0.07651        | −0.0651        |
|                | 0.23513        | 0.88902    | 0.13677          | 0.39242        | 0.46022     | 0.64638        | 0.64315        | 0.62178     | 0.5479         | 0.61508        |
| ФЖЕЛ, %        | <b>0.42612</b> | 0.018      | 0.2617           | 0.29973        | −0.0277     | −0.0713        | −0.1992        | 0.03324     | 0.1548         | −0.1454        |
|                | <b>0.03787</b> | 0.92617    | 0.12885          | 0.06025        | 0.86683     | 0.64147        | 0.21788        | 0.83445     | 0.34021        | 0.37069        |
| ОФВ1, %        | 0.13491        | −0.0456    | 0.25271          | 0.1913         | 0.18177     | −0.0466        | 0.20366        | 0.10626     | <b>0.38502</b> | 0.15945        |
|                | 0.47722        | 0.76069    | 0.07069          | 0.13312        | 0.18835     | 0.71266        | 0.13587        | 0.42313     | <b>0.00183</b> | 0.21964        |

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена *r* и *P* – уровня значимости *r*.

с развитием ХОБЛ. Уровень экспрессии данной днРНК положительно коррелировал с проводимостью дыхательных путей (ОФВ1/ФЖЕЛ), которая постепенно снижается по мере прогрессирования ХОБЛ и естественном старении легких. Согласно результатам корреляционного анализа, высокий уровень экспрессии MALAT1 в МНК чаще встречается у более молодых пациентов, что, возможно, связано с ранним развитием ХОБЛ. Подобный результат можно объяснить активным участием днРНК MALAT1 в регуляции сигнальных каскадов, связанных с клеточным старением и воспалением. Проведение биоинформатического анализа, а также подтверждение его результатов с помощью люциферазного репортерного анализа и ПЦР в реальном времени показало прямое взаимодействие MALAT1 с miR-200с в двух высоко комплементарных сайтах связывания [70], играющей ключевую роль в снижении фибротических превращений эпителиальных клеток легкого [71]. Конкурентное взаимодействие MALAT1 с miR-200с способно усиливать фибротические изменения в эпителиальных клетках легкого, важные для развития эмфиземы и ремоделировании легочной ткани при ХОБЛ. Кроме того, MALAT1 активирует передачу сигналов АКТ/mTOR, связываясь с высокоаффинной последовательностью miR-206 (сайт связывания содержит 7 нуклеотидов) и ингибируя таким образом miR-206 [49, 72], что может приводить к бронхолегочной дисплазии за счет усиления экспрессии фибронектина 1 [73]. MALAT1 способна стимулировать активность SRSF7 (serine and arginine rich splicing factor 7) и FOXp1 (forkhead box P1), связываясь с высокоаффинным сайтом miR-374b-5p [74]. Эти взаимодействия, усиливают ЭМП путем модуляции пролиферации, апоптоза [74], а также за счет контроля синтеза матричных металлопротеиназ и медиаторов воспаления в клетках эпителия легких [75]. MALAT1 взаимодействует с белками семейства FOX посредством многочисленных микроРНК, например, активность FOXA1 изменяется при связывании MALAT1 с miR-17-5p [76]. Особый интерес вызывает способность MALAT1 снижать индуцированный гипоксией апоптоз в клетках кровеносных сосудов путем ингибирования miR-19b-3p [77]. Более того, секвестрация miR-19b-3p может приводить к усилению экспрессии PPP2R5E (protein phosphatase 2 regulatory subunit B>epsilon) и BCL2L11 (BCL2 like 11), также снижая апоптоз в клетках опухолей легкого [78]. MALAT1 может подавлять активность miR-22-3p [79] и способствовать таким образом активации инфламмосомы, посредством NLRP3-опосредованного механизма, а также усиливать опосредованное STAT3 воспаление

клеток кровеносных сосудов [80]. MALAT1 может напрямую подавлять miR-590, связываясь с высокоаффинным сайтом этой микроРНК [81]. Выявлено взаимодействие MALAT1 с высокоаффинными сайтами miR-429 [82] и miR-23с [83], что может приводить к дисрегуляции ангиогенеза и, как следствие, к развитию эмфиземы [50]. Ингибирование Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), вызванное сверхэкспрессией MALAT1 при остром повреждении легкого, приводит к ингибированию NF- $\kappa$ B и MAP-киназы p38, что может снизить уровень LPS-стимулированного апоптоза клеток и продукцию факторов воспаления (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) [84]. днРНК MALAT1, экспрессия которой повышена в биоптатах легочной ткани пациентов с ХОБЛ, вовлечена в патогенез ХОБЛ [85]. Согласно [86], повышенная экспрессия MALAT1 в плазме крови положительно коррелирует с уровнем воспалительных цитокинов и может служить прогностическим маркером риска обострения ХОБЛ. ХОБЛ рассматривается как системное воспалительное заболевание, в патофизиологии которого важную роль играют повышение окислительного стресса и переход легочного воспаления в системный кровоток. Для ХОБЛ характерно одновременное увеличение количества макрофагов в периферических дыхательных путях, паренхиме и сосудах легких, активированных нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов в кровотоке [87].

Таким образом, результаты, полученные в нашем и других исследованиях, указывают на повышение уровня MALAT1 в МНК, легочной ткани и сыворотке крови больных ХОБЛ и подтверждают участие данной днРНК в развитии заболевания.

Установлена положительная корреляция между относительным уровнем экспрессии MALAT1 и LINC00342, уровень экспрессии которой у больных ХОБЛ был также значимо выше, чем у здоровых индивидов. LINC00342 активирует сигнальный каскад miR-15b/TP-BG, что способствует ЭМП в клетках карциномы легкого A549 и приводит к прогрессии и метастазированию аденокарциномы легкого [42]. Роль LINC00342 в различных злокачественных новообразованиях изучали и ранее [88]. LINC00342 связывается с сайтом miR-15b, состоящим из 6 нуклеотидов, с энергией, достаточной для формирования устойчивого взаимодействия [42, 72]. Повышение экспрессии LINC00342 при немелкоклеточном раке легкого, связывание с высокоаффинным сайтом miR-203a-3p [89], а также подавление антионкогенной активности белков p53 и PTEN являются основной причиной повышенной пролиферации и метастазирования опухолевых клеток [17, 18]. MiR-203a-3p, с которой

связывается LINC00342, функционирует как регулятор сигнального пути TGF- $\beta$ /SMAD3 и способствует TGF- $\beta$ 1-индуцированному ЭМП при бронхиальной астме [43].

Нами показано, что у больных ХОБЛ значимо снижен уровень экспрессии днРНК TP53TG1. Также выявлена положительная корреляция уровней TP53TG1 с DNM3OS и MEG3, которая находит подтверждение в биоинформатическом анализе сети взаимодействий днРНК-микроРНК-мРНК. TP53TG1 участвует в регуляции сигнального каскада TGF- $\beta$ /SMAD3, выступая как антифибротический фактор, и таких процессов, как апоптоз клеток легкого. TP53TG1 модулирует ось miR-18a-5p/PTEN в клеточной линии A549 рака легкого, связывая высокоаффинную последовательность микроРНК и усиливая проапоптотическое действие цисплатина [40]. В модели идиопатического легочного фиброза TP53TG1 воздействует на мРНК ACTA2 (actin alpha 2, smooth muscle) и Fn1 (fibronectin 1), что приводит к проявлению антифибротической активности в отношении фибробластов [41]. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что TP53TG1 функционирует как онкосупрессор. Запуская убиквитинзависимую деградацию пероксиредоксина 4 (PRDX4), TP53TG1 блокирует сигнальный путь WNT/ $\beta$ -катенин, тем самым подавляя прогрессию гепатоклеточного рака и развитие фиброза печени [14]. Показано, что TP53TG1 ингибирует развитие рака молочной железы, подавляя сигнальный путь PI3K/AKT [90]. Таким образом, высокий уровень TP53TG1 негативно влияет на молекулярные механизмы ускоренного клеточного старения, ингибируя сигнальные каскады TGF- $\beta$ /SMAD и PI3K/AKT. Роль TP53TG1 при ХОБЛ ранее не изучали, поэтому результаты, полученные нами на МНК, необходимо подтвердить на образцах легочной ткани.

Наибольший интерес представляет прямая корреляция экспрессии днРНК TP53TG1 и мРНК TGFB2, совместная оценка экспрессии которых с использованием ROC-анализа также показала наибольшую прогностическую значимость для дискриминации больных ХОБЛ и здоровых индивидов. Эти два транскрипта функционально связаны, так как TP53TG1 является регулятором сигнального каскада TGF- $\beta$ /SMAD, а TGFB2 его ключевой молекулой. Нами выявлено снижение уровня экспрессии TGFB2 в МНК больных ХОБЛ и его корреляция с возрастом больных и показателем легочной функции ОФВ1/ФЖЕЛ. Согласно данным биоинформатического анализа, TGFB2, будучи активатором сигнального каскада TGF- $\beta$ /SMAD2/SMAD3/SMAD4, усиливает ЭМП, способствует фиброзу и обладает

антиапоптотическим действием [30]. В свою очередь, SMAD2 и SMAD3 стимулируют экспрессию генов мезенхимального фенотипа: *FN1*, *SNAI2* и *MMP2* [91], повышенная активность которых при ХОБЛ может способствовать ремоделированию легочной ткани и воздухоносных путей. С другой стороны, TGFB2 вовлечен в антиоксидантный ответ: взаимодействие между TGFB2 и C/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer binding protein alpha) положительно влияет на дифференцировку и секреторную активность эпителиальных клеток легкого на фоне повреждения в ответ на гипероксию [92]. Масштабное РНК-секвенирование позволило выявить снижение уровня экспрессии гена *TGFB2* в легочной ткани больных ХОБЛ [93].

Таким образом, изменение профиля экспрессии TGFB2 в МНК больных ХОБЛ может быть связано с ранним развитием заболевания и быстрым снижением показателей проводимости воздухоносных путей.

Нами показано двукратное снижение уровня днРНК DNM3OS у больных ХОБЛ, более того, выявлена его корреляция с величиной ФЖЕЛ, что отражает постепенное прогрессирование обструкции дыхательных путей. Установлено, что уровень экспрессии DNM3OS положительно коррелирует с уровнями других днРНК (*H19*, *MEG3* и *TP53TG1*) и отрицательно – с уровнем *MALAT1*. Согласно данным биоинформатического анализа, через мРНК-мишени и микроРНК DNM3OS взаимодействует с генами *MALAT1*, *H19*, *MEG3* и *TP53TG1*. DNM3OS участвует в регуляции каскада TGF- $\beta$ /SMAD [20] и в таких ключевых процессах фиброзной трансформации клеток верхних дыхательных путей, как жизнеспособность и миграционный потенциал, что обусловлено его способностью ингибировать действие miR-204-5p посредством взаимодействия с высокоаффинным сайтом связывания из 11 нуклеотидов и дополнительных последовательностями [94] с последующей активацией HIP1 (huntingtin interacting protein 1) [95]. DNM3OS фрагментируется на три микроРНК, каждая из которых вовлечена в регуляцию ключевых сигнальных каскадов, связанных с апоптозом, ЭМП и пролиферацией [20]. Показано, что miR-199a участвует в регуляции экспрессии *SIRT1* в альвеолярных макрофагах, тем самым модулируя легочное воспаление при остром респираторном дистресс-синдроме [96]. Дисрегуляция DNM3OS и происходящих из нее микроРНК связана с различными хроническими заболеваниями [19]. Уровень экспрессии DNM3OS повышен при легочном фиброзе [20]. Повышение уровня экспрессии только miR-199a-5p в легочной ткани при ХОБЛ

наблюдали и ранее [97], тогда как экспрессия DNM3OS при ХОБЛ изучена впервые.

Таким образом, нами впервые показано изменение экспрессии днРНК DNM3OS в МНК больных ХОБЛ и корреляция таких изменений с показателями внешнего дыхания, что может быть связано с участием данной днРНК и происходящих из нее микроРНК в регуляции сигнальных каскадов TGF- $\beta$ /SMAD и воспаления, что требует проведения исследований на образцах легочной ткани.

Нами не выявлены различия в уровне экспрессии днРНК H19, MEG3 и мРНК PTEN, FOXO3 и KEAP1 в МНК больных ХОБЛ и здоровых индивидов. Необходимо отметить, что корреляционный анализ позволил показать вовлеченность генов *FOXO3* и *KEAP1* в прогрессирование обструкции дыхательных путей. Так, показана корреляция между уровнями экспрессии данных генов и показателями функции легочного дыхания, что указывает на их потенциальное участие в процессах старения легочной ткани, выражающееся в постепенном снижении проводимости воздухоносных путей, ремоделировании бронхов и бронхиол, развитии фиброзных и эмфизематозных изменений.

В заключение следует отметить, что в нашем исследовании показана дифференциальная экспрессия днРНК TP53TG1, LINC00342, DNM3OS, MALAT1 и мРНК TGFB2 в МНК больных ХОБЛ и здоровых доноров, при этом днРНК TP53TG1, LINC00342 и DNM3OS анализировали впервые. Полученные результаты требуют дальнейшего подтверждения на образцах легочной ткани больных ХОБЛ. Получена высокоинформативная прогностическая модель развития ХОБЛ, которая включает одновременную оценку уровня экспрессии днРНК TP53TG1 и мРНК TGFB2. Дифференциально экспрессирующиеся днРНК (TP53TG1, LINC00342, DNM3OS, MALAT1) и белоккодирующий ген *TGFB2* функционально действуют как регуляторы апоптоза, воспаления, фиброгенеза и ЭМП, что указывает на активную роль процессов клеточного старения в молекулярном патогенезе ХОБЛ. Полученные результаты могут служить основой для усовершенствования диагностических критериев и разработки принципиально новых лекарственных препаратов.

Исследование получило финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 23-25-00019, <https://rscf.ru/project/23-25-00019/>).

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым

нормам этики. Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утвержденную в составе протокола исследования этическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 19, от 01.11.2022 г.).

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

**Дополнительные материалы** размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/upp\\_Markelov\\_rus.zip](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/upp_Markelov_rus.zip).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Лещенко И.В., Овчаренко С.И., Шмелев Е.И. (2022) Хроническая обструктивная болезнь легких: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению. *Пульмонология*. **32**(3), 356–392.
2. Agustí A., Celli B.R., Criner G.J., Halpin D., Anzueto A., Barnes P., Bourbeau J., Han M.K., Martinez F.J., Montes de Oca M., Mortimer K., Papi A., Pavord I., Roche N., Salvi S., Sin D.D., Singh D., Stockley R., López Varela M.V., Wedzicha J.A., Vogelmeier C.F. (2023) Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: GOLD executive summary. *Eur. Respir. J.* **61**(4), 2300239.
3. Ragland M.F., Benway C.J., Lutz S.M., Bowler R.P., Hecker J., Hokanson J.E., Crapo J.D., Castaldi P.J., DeMeo D.L., Hersh C.P., Hobbs B.D., Lange C., Beaty T.H., Cho M.H., Silverman E.K. (2019) Genetic advances in chronic obstructive pulmonary disease: insights from COPDGene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**(6), 677–690.
4. Choudhury G., MacNee W. (2017) Role of inflammation and oxidative stress in the pathology of ageing in COPD: potential therapeutic interventions. *COPD*. **14**(1), 122–135.
5. Aghali A., Koloko Ngassie M.L., Pabelick C.M., Prakash Y.S. (2022) Cellular senescence in aging lungs and diseases. *Cells*. **11**(11), 1781.
6. Birch J., Anderson R.K., Correia-Melo C., Jurk D., Hewitt G., Marques F.M., Green N.J., Moisey E., Birrell M.A., Belvisi M.G., Black F., Taylor J.J., Fisher A.J., De Souza A., Passos J.F. (2015) DNA damage response at telomeres contributes to lung ageing and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**(10), L1124–L1137.
7. Barnes P.J., Baker J., Donnelly L.E. (2019) Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**(5), 556–564.
8. Brandsma C.A., de Vries M., Costa R., Woldhuis R.R., Königshoff M., Timens W. (2017) Lung ageing and COPD: is there a role for ageing in abnormal tissue repair? *Eur. Respir. Rev.* **26**(146), 170073.
9. Puvvula P.K. (2019) LncRNAs regulatory networks in cellular senescence. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(11), 2615.

10. Long Y., Wang X., Youmans D.T., Cech T.R. (2017) How do lncRNAs regulate transcription? *Sci. Adv.* **3**(9), eaao2110.
11. Ferrè F., Colantoni A., Helmer-Citterich M. (2016) Revealing protein-lncRNA interaction. *Brief Bioinform.* **17**(1), 106–116.
12. Маркелов В.А., Корытина Г.Ф., Азнабаева Ю.Г., Зулкарнеев Ш.Р., Ахмадишина Л.З., Загидуллин Н.Ш. (2023) Роль сигнальных путей, вовлеченных в механизмы клеточного старения, и регуляторных некодирующих РНК в развитии хронической обструктивной болезни легких. *Гены и клетки.* **18**(2), 93–108.
13. Lu Q., Guo Q., Xin M., Lim C., Gamero A.M., Gerhard G.S., Yang L. (2021) LncRNA TP53TG1 promotes the growth and migration of hepatocellular carcinoma cells via activation of ERK signaling. *Non-coding RNA.* **7**(3), 52.
14. Chen B., Lan J., Xiao Y., Liu P., Guo D., Gu Y., Song Y., Zhong Q., Ma D., Lei P., Liu Q. (2021) Long noncoding RNA TP53TG1 suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the PRDX4/ $\beta$ -catenin pathway. *Cancer Lett.* **513**, 75–89.
15. Ersahin T., Tuncbag N., Cetin-Atalay R. (2015) The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* **11**(7), 1946–1954. doi: 10.1039/c5mb00101c. PMID: 25924008.
16. Wang L., Chen Z., An L., Wang Y., Zhang Z., Guo Y., Liu C. (2016) Analysis of long non-coding RNA expression profiles in non-small cell lung cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **38**(6), 2389–400.
17. Chen Q.F., Kong J.L., Zou S.C., Gao H., Wang F., Qin S.M., Wang W. (2019) LncRNA LINC00342 regulated cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer via targeting miR-203a-3p. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(17), 7408–7418.
18. Tang H., Zhao L., Li M., Li T., Hao Y. (2019) Investigation of LINC00342 as a poor prognostic biomarker for human patients with non-small cell lung cancer. *J. Cell. Biochem.* **120**(4), 5055–5061.
19. Fellah S., Larrue R., Truchi M., Vassaux G., Mari B., Cauffiez C., Pottier N. (2023) Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **14**(2), e1736.
20. Savary G., Dewaeles E., Diazi S., Buscot M., Nottet N., Fassy J., Courcot E., Henaoui I.S., Lemaire J., Martis N., Van der Hauwaert C., Pons N., Magnone V., Leroy S., Hofman V., Plantier L., Lebrigand K., Paquet A., Lino Cardenas C.L., Vassaux G., Hofman P., Günther A., Crestani B., Wallaert B., Rezzonico R., Brousseau T., Glowacki F., Bellusci S., Perrais M., Broly F., Barbry P., Marquette C.H., Cauffiez C., Mari B., Pottier N. (2019) The long noncoding RNA DNMT3OS is a reservoir of fibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- $\beta$  and pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**(2), 184–198.
21. Zeng R., Zhang R., Song X., Ni L., Lai Z., Liu C., Ye W. (2018) The long non-coding RNA MALAT1 activates Nrf2 signaling to protect human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**(4), 2532–2538.
22. Ghafouri-Fard S., Esmaceli M., Taheri M. (2020) H19 lncRNA: roles in tumorigenesis. *Biomed. Pharmacother.* **123**, 109774.
23. Lu Q., Guo Z., Xie W., Jin W., Zhu D., Chen S., Ren T. (2018) The lncRNA H19 mediates pulmonary fibrosis by regulating the miR-196a/COL1A1 axis. *Inflammation.* **41**(3), 896–903.
24. Xu J.L., Hua T., Ding J., Fan Y., Liu Z.J., Lian J.W. (2019) FOXF2 aggravates the progression of non-small cell lung cancer through targeting lncRNA H19 to down regulate PTEN. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(24), 10796–10802.
25. 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.
26. Zhan H., Sun X., Wang X., Gao Q., Yang M., Liu H., Zheng J., Gong X., Feng S., Chang X., Sun Y. (2021) LncRNA MEG3 involved in NiO NPs-induced pulmonary fibrosis via regulating TGF- $\beta$ 1-mediated PI3K/AKT pathway. *Toxicol. Sci.* **182**(1), 120–131.
27. Cai B., Yang L., Do Jung Y., Zhang Y., Liu X., Zhao P., Li J. (2022) PTEN: an emerging potential target for therapeutic intervention in respiratory diseases. (2022) *Oxid. Med. Cell. Longev.* 4512503.
28. Chen C.Y., Chen J., He L., Stiles B.L. (2018) PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. *Front. Endocrinol.* **9**, 338.
29. Ishtiaq Ahmed A.S., Bose G.C., Huang L., Azhar M. (2014) Generation of mice carrying a knockout-first and conditional-ready allele of transforming growth factor beta2 gene. *Genesis.* **52**(9), 817–826.
30. Schepers D., Tortora G., Morisaki H., MacCarrick G., Lindsay M., Liang D., Mehta S.G., Hague J., Verhagen J., van de Laar I., Wessels M., Detisch Y., van Haelst M., Baas A., Lichtenbelt K., Braun K., van der Linde D., Roos-Hesselink J., McGillivray G., Meester J., Maystadt I., Coucke P., El-Khoury E., Parkash S., Diness B., Risom L., Scurr I., Hilhorst-Hofstee Y., Morisaki T., Richer J., Désir J., Kempers M., Rideout A.L., Horne G., Bennett C., Rahikkala E., Vandeweyer G., Alaerts M., Verstraeten A., Dietz H., Van Laer L., Loeys B. (2018) A mutation update on the LDS-associated genes TGF $\beta$ 2/3 and SMAD2/3. *Hum. Mutat.* **39**(5), 621–634.
31. Stefanetti R.J., Voisin S., Russell A., Lamon S. (2018) Recent advances in understanding the role of FOXO3. *F1000Res.* **7**, F1000 Fac. Rev–1372.
32. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. (2018) Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1865**(5), 721–733.
33. Cheng L., Wang P., Tian R., Wang S., Guo Q., Luo M., Zhou W., Liu G., Jiang H., Jiang Q. (2019) LncRNA2Target v2.0: a comprehensive database for target genes of lncRNAs in human and mouse. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D140–D144.
34. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods.* **25**(4), 402–408.
35. Lin W., Liu H., Tang Y., Wei Y., Wei W., Zhang L., Chen J. (2021) The development and controversy of

- competitive endogenous RNA hypothesis in non-coding genes. *Mol. Cell. Biochem.* **476**(1), 109–123.
36. Bosson A.D., Zamudio J.R., Sharp P.A. (2014) Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol. Cell.* **56**(3), 347–359.
  37. Jens M., Rajewsky N. (2015) Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation. *Nat. Rev. Genetics.* **16**(2), 113–126.
  38. Yuan Y., Liu B., Xie P., Zhang M. Q., Li Y., Xie Z., Wang X. (2015) Model-guided quantitative analysis of microRNA-mediated regulation on competing endogenous RNAs using a synthetic gene circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**(10), 3158–3163.
  39. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods.* **4**(9), 721–726.
  40. Xiao H., Liu Y., Liang P., Wang B., Tan H., Zhang Y., Gao X., Gao J. (2018) TP53TG1 enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-18a/PTEN axis. *Cell Biosci.* **8**, 23.
  41. Sun J., Guo Y., Chen T., Jin T., Ma L., Ai L., Guo J., Niu Z., Yang R., Wang Q., Yu X., Gao H., Zhang Y., Su W., Song X., Ji W., Zhang Q., Huang M., Fan X., Du Z., Liang H. (2022) Systematic analyses identify the anti-fibrotic role of lncRNA TP53TG1 in IPF. *Cell Death Dis.* **13**(6), 525.
  42. Su H., Yu S., Sun F., Lin D., Liu P., Zhao L. (2022) LINC00342 induces metastasis of lung adenocarcinoma by targeting miR-15b/TPBG. *Acta Biochim. Pol.* **69**(2), 291–297.
  43. Fan Q., Jian Y. (2020) MiR-203a-3p regulates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in asthma by regulating Smad3 pathway through SIX1. *Biosci. Rep.* **40**(2), BSR20192645.
  44. van Nijmegen J., Brandsma C.A., Steiling K., Hiemstra P.S., Timens W., van den Berge M., Faiz A. (2022) High miR203a-3p and miR-375 expression in the airways of smokers with and without COPD. *Sci. Rep.* **12**(1), 5610.
  45. Yu H., Qi N., Zhou Q. (2021) LncRNA H19 inhibits proliferation and migration of airway smooth muscle cells induced by PDGF-BB through miR-21/PTEN/Akt Axis. *J. Asthma Allergy.* **14**, 71–80.
  46. Gutschner T., Hämmerle A., Eissmann M., Hsu J., Kim Y., Hung G., Revenko A., Arun G., Stentrup M., Gross M., Zörnig M., MacLeod A.R., Spector D.L., Diederichs S. (2013) The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* **73**(3), 1180–1189.
  47. Lu L., Luo F., Liu Y., Liu X., Shi L., Lu X., Liu Q. (2015) Posttranscriptional silencing of the lncRNA MALAT1 by miR-217 inhibits the epithelial-mesenchymal transition via enhancer of zeste homolog 2 in the malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **289**(2), 276–285.
  48. Chen W., Zhao W., Zhang L., Wang L., Wang J., Wan Z., Hong Y., Yu L. (2017) MALAT1-miR-101-SOX9 feedback loop modulates the chemo-resistance of lung cancer cell to DDP via Wnt signaling pathway. *Oncotarget.* **8**(55), 94317–94329.
  49. Tang Y., Xiao G., Chen Y., Deng Y. (2018) LncRNA MALAT1 promotes migration and invasion of non-small-cell lung cancer by targeting miR-206 and activating Akt/mTOR signaling. *Anticancer Drugs.* **29**(8), 725–735.
  50. Green C.E., Clarke J., Bicknell R., Turner A.M. (2021) Pulmonary microRNA changes alter angiogenesis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Biomedicine.* **9**(7), 830.
  51. Shen Y., Yang Y., Li Y. (2020) MiR-133a acts as a tumor suppressor in lung cancer progression by regulating the LASP1 and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. *Thorac. Cancer.* **11**(12), 3473–3481.
  52. Gokey J.J., Snowball J., Sridharan A., Speth J.P., Black K.E., Hariri L.P., Perl A.T., Xu Y., Whitsett J.A. (2018) MEG3 is increased in idiopathic pulmonary fibrosis and regulates epithelial cell differentiation. *JCI Insight.* **3**(17), e122490.
  53. Li W., Qiu X., Jiang H., Han Y., Wei D., Liu J. (2016) Downregulation of miR-181a protects mice from LPS-induced acute lung injury by targeting Bcl-2. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 1375–1382.
  54. Su Y., Silva J.D., Doherty D., Simpson D.A., Weiss D.J., Rolandsson-Enes S., McAuley D.F., O’Kane C.M., Brazil D.P., Krasnodembskaya A.D. (2023) Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles reprogramme macrophages in ARDS models through the miR-181a-5p-PTEN-pSTAT5-SOCS1 axis. *Thorax.* **78**(6), 617–630.
  55. Ma J., Chen S., Liu Y., Han H., Gong M., Song Y. (2022) The role of exosomal miR-181b in the cross-talk between NSCLC cells and tumor-associated macrophages. *Genes Genomics.* **44**(10), 1243–1258.
  56. Wu H., Ma H., Wang L., Zhang H., Lu L., Xiao T., Cheng C., Wang P., Yang Y., Wu M., Wang S., Zhang J., Liu Q. (2022) Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1 $\alpha$ . *Int. J. Biol. Sci.* **18**(2), 661–674.
  57. Zhao Y., Li A. (2021) miR-19b-3p relieves intervertebral disc degeneration through modulating PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Aging.* **13**(18), 22459–22473.
  58. Li H., Zhang P., Sun X., Sun Y., Shi C., Liu H., Liu X. (2015) MicroRNA-181a regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting PTEN in drug-resistant lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **47**(4), 1379–1392.
  59. Horita H., Wysoczynski C.L., Walker L.A., Moulton K.S., Li M., Ostriker A., Tucker R., McKinsey T.A., Churchill M.E., Nemenoff R.A., Weiser-Evans M.C. (2016) Nuclear PTEN functions as an essential regulator of SRF-dependent transcription to control smooth muscle differentiation. *Nat. Commun.* **7**, 10830.
  60. Chen G., Yu L., Dong H., Liu Z., Sun Y. (2019) MiR-182 enhances radioresistance in non-small cell lung cancer cells by regulating FOXO3. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **46**(2), 137–143.
  61. Wang S., Sun Y., Yao L., Xing Y., Yang H., Ma Q. (2024) The role of microRNA-23a-3p in the progression of human aging process by targeting FOXO3a. *Mol. Biotechnol.* **66**(2), 277–287.

62. Wang Y.Q., Cao Q., Wang F., Huang L.Y., Sang T.T., Liu F., Chen S.Y. (2015) SIRT1 protects against oxidative stress-induced endothelial progenitor cells apoptosis by inhibiting FOXO3a via FOXO3a ubiquitination and degradation. *J. Cell. Physiol.* **230**(9), 2098–2107.
63. Zhang C., Kong X., Ma D. (2020) miR-141-3p inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration via regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. *IUBMB Life.* **72**(10), 2167–2179.
64. Thu K.L., Pikor L.A., Chari R., Wilson I.M., Macaulay C.E., English J.C., Tsao M.S., Gazdar A.F., Lam S., Lam W.L., Lockwood W.W. (2011) Genetic disruption of KEAP1/CUL3 E3 ubiquitin ligase complex components is a key mechanism of NF-kappaB pathway activation in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **6**(9), 1521–1529.
65. Liao H., Liang Y., Kang L., Xiao Y., Yu T., Wan R. (2021) miR4543p inhibits nonsmall cell lung cancer cell proliferation and metastasis by targeting TGFβ2. *Oncol. Rep.* **45**(5), 67.
66. Zhong L., Yang H., Zhu B., Zhao X., Xie M., Cao M., Liu C., Zhao D., Lyu Y., Shang W., Wang B., Wu Y., Sun X., Qiu G., Fu W., Jiang H. (2022) The TBX1/miR-193a-3p/TGF-β2 axis mediates CHD by promoting ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, 5130546.
67. Paliwal S., Shi J., Dhru U., Zhou Y., Schuger L. (2004) P311 binds to the latency associated protein and downregulates the expression of TGF-beta1 and TGF-beta2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**(4), 1104–1109.
68. Khankan R., Oliver N., He S., Ryan S.J., Hinton D.R. (2011) Regulation of fibronectin-EDA through CTGF domain-specific interactions with TGFβ2 and its receptor TGFβRII. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**(8), 5068–5078.
69. Yang B., Bai J., Shi R., Shao X., Yang Y., Jin Y., Che X., Zhang Y., Qu X., Liu Y., Li Z. (2020) TGFβ2 serves as a link between epithelial-mesenchymal transition and tumor mutation burden in gastric cancer. *Int. Immunopharmacol.* **84**, 106532.
70. Li Q., Zhang C., Chen R., Xiong H., Qiu F., Liu S., Zhang M., Wang F., Wang Y., Zhou X., Xiao G., Wang X., Jiang Q. (2016) Disrupting MALAT1/miR-200c sponge decreases invasion and migration in endometrioid endometrial carcinoma. *Cancer Lett.* **383**(1), 28–40.
71. Yang S., Banerjee S., de Freitas A., Sanders Y.Y., Ding Q., Matalon S., Thannickal V.J., Abraham E., Liu G. (2011) Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **180**(2), 484–493.
72. Lin W., Liu H., Tang Y., Wei Y., Wei W., Zhang L., Chen J. (2021) The development and controversy of competitive endogenous RNA hypothesis in non-coding genes. *Mol. Cell. Biochem.* **476**(1), 109–123.
73. Zhang X., Xu J., Wang J., Gortner L., Zhang S., Wei X., Song J., Zhang Y., Li Q., Feng Z. (2013) Reduction of microRNA-206 contributes to the development of bronchopulmonary dysplasia through up-regulation of fibronectin 1. *PLoS One.* **8**(9), e74750.
74. Song J., Su Z.Z., Shen Q.M. (2020) Long non-coding RNA MALAT1 regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion via miR-374b-5p/SRSF7 axis in non-small cell lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **24**(4), 1853–1862.
75. Andreas A., Maloy A., Nyunoya T., Zhang Y., Chandra D. (2022) The *FoxP1* gene regulates lung function, production of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators, and viability of lung epithelia. *Respir. Res.* **23**(1), 281.
76. Wei S., Wang K., Huang X., Tang W., Zhao Z., Zhao Z. (2019) Knockdown of the lncRNA MALAT1 alleviates lipopolysaccharide-induced A549 cell injury by targeting the miR175p/FOXA1 axis. *Mol. Med. Rep.* **20**(2), 2021–2029.
77. Liu H., Shi C., Deng Y. (2020) MALAT1 affects hypoxia-induced vascular endothelial cell injury and autophagy by regulating miR-19b-3p/HIF-1α axis. *Mol. Cell. Biochem.* **466**(1–2), 25–34.
78. Baumgartner U., Berger F., Hashemi Gheinani A., Burgener S.S., Monastyrskaya K., Vassella E. (2018) MiR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer.* **17**(1), 44.
79. Zhang Z., Li M., Zhang Z. (2020) lncRNA MALAT1 modulates oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-22-3p. *Oncotargets. Therapy.* **13**, 1343–1354.
80. Yang K., Li W., Duan W., Jiang Y., Huang N., Li Y., Ren B., Sun J. (2019) Resveratrol attenuates pulmonary embolism associated cardiac injury by suppressing activation of the inflammasome via the MALAT1-miR223p signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **44**(6), 2311–2320.
81. Zhou Q., Run Q., Li C.Y., Xiong X.Y., Wu X.L. (2020) LncRNA MALAT1 promotes STAT3-mediated endothelial inflammation by counteracting the function of miR-590. *Cytogenet. Genome Res.* **160**(10), 565–578.
82. Shen F., Zheng H., Zhou L., Li W., Xu X. (2019) Overexpression of MALAT1 contributes to cervical cancer progression by acting as a sponge of miR-429. *J. Cell. Physiol.* **234**(7), 11219–11226.
83. Liu C., Zhuo H., Ye M.Y., Huang G.X., Fan M., Huang X.Z. (2020) LncRNA MALAT1 promoted high glucose-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cell by sponging miR-30c targeting for NLRP3. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **36**(9), 682–691.
84. Lai X., Zhong J., Zhang A., Zhang B., Zhu T., Liao R. (2022) Focus on long non-coding RNA MALAT1: insights into acute and chronic lung diseases. *Front. Genet.* **13**, 1003964.
85. Hu T.J., Huang H.B., Shen H.B., Chen W., Yang Z.H. (2020) Role of long non-coding RNA MALAT1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp. Ther. Med.* **20**(3), 2691–2697.
86. Liu S., Liu M., Dong L. (2020) The clinical value of lncRNA MALAT1 and its targets miR-125b, miR-133, miR-146a, and miR-203 for predicting disease progression in chronic obstructive pulmonary disease patients. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**(9), e23410.
87. Barnes P.J. (2016) Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**(1), 16–27.

88. Shen P., Qu L., Wang J., Ding Q., Zhou C., Xie R., Wang H., Ji G. (2021) LncRNA LINC00342 contributes to the growth and metastasis of colorectal cancer via targeting miR-19a-3p/NPEPL1 axis. *Cancer Cell Int.* **21**(1), 105.
89. Chen Q.F., Kong J.L., Zou S.C., Gao H., Wang F., Qin S.M., Wang W. (2019) LncRNA LINC00342 regulated cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer via targeting miR-203a-3p. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(17), 7408–7418.
90. Shao M., Ma H., Wan X., Liu Y. (2020) Survival analysis for long noncoding RNAs identifies TP53TG1 as an antioncogenic target for the breast cancer. *J. Cell. Physiol.* **235**(10), 6574–6581.
91. Deng H., Schwartz M.A. (2022) High fluid shear stress inhibits cytokine-driven Smad2/3 activation in vascular endothelial cells. *J. Am. Heart Assoc.* **11**(14), e025337.
92. Zhu Y., Chen X., Mi L., Wang Q., Zhu H., Ju H., Lu H. (2020) Sumoylation of CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$  inhibits lung differentiation in bronchopulmonary dysplasia model rats. *J. Cell. Mol. Med.* **24**(12), 7067–7071.
93. Ghosh A.J., Hobbs B.D., Yun J.H., Saferali A., Moll M., Xu Z., Chase R.P., Morrow J., Ziniti J., Sciurba F., Barwick L., Limper A.H., Flaherty K., Criner G., Brown K.K., Wise R., Martinez F.J., McGoldrick D., Cho M.H., DeMeo D.L., Silverman E.K., Castaldi P.J., NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium, Hersh C.P. (2022) Lung tissue shows divergent gene expression between chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* **23**(1), 97.
94. He L., He G. (2021) DN3OS facilitates ovarian cancer progression by regulating miR-193a-3p/MAP3K3 axis. *Yonsei Med. J.* **62**(6), 535–544.
95. Fang X., Tang Z., Zhang H., Quan H. (2020) Long non-coding RNA DN3OS/miR-204-5p/HIP1 axis modulates oral cancer cell viability and migration. *J. Oral. Pathol. Med.* **49**(9), 865–875.
96. Liu Y., Guan H., Zhang J.L., Zheng Z., Wang H.T., Tao K., Han S.C., Su L.L., Hu D. (2018) Acute downregulation of miR-199a attenuates sepsis-induced acute lung injury by targeting SIRT1. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **314**(4), C449–C455.
97. Mizuno S., Bogaard H.J., Gomez-Arroyo J., Alhusaini A., Kraskauskas D., Cool C.D., Voelkel N.F. (2012) MicroRNA-199a-5p is associated with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in lungs from patients with COPD. *Chest.* **142**(3), 663–672.

## Expression of Long Non-Coding RNAs and Protein-Coding Genes Involved in Cellular Senescence in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

V. A. Markelov<sup>1, 2</sup>, G. F. Korytina<sup>1, 2, \*</sup>, Y. G. Aznabaeva<sup>2</sup>, I. A. Gibadullin<sup>2</sup>,  
L. Z. Akhmadishina<sup>1, 3</sup>, T. R. Nasibullin<sup>1</sup>, O. V. Kochetova<sup>1</sup>, A. M. Avzaletdinov<sup>2</sup>, N. Sh. Zagidullin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), Ufa, 450054 Russia

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia

<sup>3</sup>Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, 450064 Russia

\*e-mail: guly\_kory@mail.ru

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex chronic heterogeneous respiratory inflammatory disease. The disease develops as a result of complex interaction of molecular genetic factors, a network of epigenetic regulators and environmental exposure. COPD pathogenesis may also involve dysregulation of stress responses preventing cellular senescence, encompassing a wide range of signaling pathways and their epigenetic regulators, including long noncoding RNAs (lncRNAs). In order to assess the contribution of genes involved in key signaling pathways related to cellular senescence to the molecular pathogenesis of COPD the expression profile of long non-coding RNA (TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DN3OS, MEG3) and protein-coding genes (*PTEN*, *TGFB2*, *FOXO3*, *KEAP1*) in peripheral blood mononuclear cells of COPD patients ( $n = 92$ ) and controls ( $n = 81$ ) was evaluated. Significant downregulation of lncRNAs TP53TG1, DN3OS and mRNA *TGFB2* expression levels was found. The expression levels of ncRNAs MALAT1 and LINC00342 were upregulated in COPD patients. Based on the results of multiple regression and ROC-analysis, a highly informative prognostic model was determined, which included simultaneous expression level assessment of *TP53TG1* and *TGFB2* (AUC = 0.92). A positive correlation of MALAT1, DN3OS, *TGFB2*, *FOXO3* and *KEAP1* expression levels with lung function parameters which reflect the disease progression was established. The differentially expressed lncRNAs (TP53TG1, LINC00342, DN3OS, MALAT1) and protein-coding gene *TGFB2* detected in the study functionally act as regulators of apoptosis, inflammation, fibrogenesis and epithelial-mesenchymal transition, indicating an active role of cellular senescence processes in the molecular pathogenesis of COPD.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease, oxidative stress, cellular senescence, long non-coding RNAs

## ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ V546E И D547N В МОТИВЕ RBM-B НЕ ВЛИЯЮТ НА СВЯЗЫВАНИЕ ПРАЙМАЗЫ-ПОЛИМЕРАЗЫ PRIMPOL С РЕПЛИКАТИВНЫМ БЕЛКОМ А И ДНК

© 2024 г. А. А. Манукян<sup>a</sup>, А. В. Макарова<sup>a, b</sup>, Е. О. Болдинова<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>b</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: lizaboldinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024 г.

После доработки 28.02.2024 г.

Принята к публикации 04.03.2024 г.

Праймаза-полимераза PrimPol человека – ключевой участник механизма реинициации синтеза ДНК при остановке репликативной вилки на поврежденных участках. PrimPol обладает ДНК-праймазной активностью и синтезирует ДНК-праймеры, которые используются процессивными ДНК-полимеразами для продолжения репликации. Привлечение PrimPol к поврежденному участку ДНК, а также активация каталитической активности PrimPol происходят за счет взаимодействия с репликативным белком А (RPA), связывающим оцДНК. В С-концевом домене PrimPol расположен отрицательно заряженный мотив связывания с RPA (RBM, RPA-binding motif), мутации которого нарушают взаимодействие двух белков. Мотив RBM участвует также в негативной регуляции взаимодействия PrimPol с ДНК. Делеция RBM резко повышает аффинность PrimPol к ДНК и активность PrimPol. Механизм опосредованной RBM регуляции активности PrimPol не установлен. Свой вклад во взаимодействие PrimPol с RPA и ДНК потенциально может вносить относительно сильный отрицательный заряд RBM. В RBM можно отдельно выделить участки RBM-A и RBM-B. В представленной работе мы дополнительно добавили (замена V546E) или понизили (замена D547N) отрицательный заряд в RBM-B PrimPol и биохимически охарактеризовали мутантные варианты. Показано, что локальное изменение заряда RBM-B не влияет на взаимодействие PrimPol с ДНК и RPA, а также на каталитическую активность фермента.

**Ключевые слова:** праймаза-полимераза PrimPol, репликация, реинициация синтеза ДНК, репликативный белок А

DOI: 10.31857/S0026898424050122, EDN: HUAYQY

### ВВЕДЕНИЕ

Праймаза-полимераза PrimPol человека впервые была охарактеризована в 2013 году [1–3]. Будучи ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, PrimPol синтезирует также праймеры *de novo* [1]. PrimPol, как и репликативная РНК-праймаза человека, относится к суперсемейству археозукариотических праймаз, представленных у эукариот, архей и ряда вирусов [4]. Однако в отличие от репликативной РНК-праймазы PrimPol синтезирует ДНК-праймеры [1]. В качестве инициаторного нуклеотида PrimPol преимущественно использует АТР, но при дальнейшем синтезе прай-

мера с большей эффективностью включает дезоксирибонуклеотиды, чем рибонуклеотиды [1, 5] PrimPol действует преимущественно на лидирующей цепи [6, 7] в поврежденных участках ДНК [8–10]. PrimPol поддерживает стабильность генома как в ядре, так и в митохондриях. Нарушение функционирования PrimPol приводит к снижению скорости пролиферации клеток, нарушению клеточного цикла, накоплению хромосомных aberrаций и подавлению репликации митохондриальной ДНК [1–3, 11–14]. Предполагается, что мутации PrimPol связаны с развитием офтальмологических заболеваний у человека [15–18], усилением митохондриальной токсичности противовирусных препаратов [19] и повышением устойчивости клеток к химиотерапевтическим препаратам [20, 21].

Сокращения: RPA – репликативный белок А, RBM – мотив связывания с RPA (RPA-binding motif).

PrimPol состоит из N-концевого каталитического и C-концевого регуляторного доменов [1, 22–24]. C-концевой домен включает мотив цинкового пальца (ZnFn), необходимый для праймазной активности, и мотив связывания с белком RPA (replicative protein A) – RBM (RPA-binding motif) [1, 22]. RPA является одним из ключевых регуляторов активности PrimPol, привлекая ее к участкам повреждения ДНК и стимулируя каталитическую активность [9, 10, 24]. В RBM PrimPol выделяют два отрицательно заряженных участка – RBM-A (остатки 513–527) и RBM-B (остатки 546–560), которые взаимодействуют с положительно заряженным участком субъединицы RPA1 размером 70 кДа (RPA70N) [9]. Согласно структуре RBM PrimPol в комплексе с RPA70N, ключевыми остатками PrimPol, участвующими в образовании солевых мостиков и гидрофобных связей между белками являются Asp519, Ile517 и Phe522 RBM-A и Glu548, Asp551 и Ile554 RBM-B [9]. Мутации RBM-A D519R/F522A и RBM-B D551R/I554A снижают эффективность взаимодействия PrimPol с RPA и нарушают привлечение PrimPol к участкам повреждения ДНК [9]. Показано, что одиночные полиморфные замены в RBM-A (F522V) и RBM-B (I554T), обнаруженные у пациентов с аденокарциномой и лимфомой, также снижают эффективность связывания RBM PrimPol с белком RPA [9].

Ранее мы показали, что RBM играет роль в негативной регуляции взаимодействия PrimPol с ДНК. Делеция RBM значительно повышает каталитическую активность и аффинность PrimPol к ДНК, при этом взаимодействие с RPA нарушается [24]. Однако механизм RBM-опосредованной регуляции PrimPol не установлен. Можно предположить, что отрицательный заряд RBM вносит определенный вклад в негативную регуляцию работы PrimPol, препятствуя эффективному связыванию PrimPol с отрицательно заряженной ДНК. В свою очередь, связывание RBM с белком RPA может устранять электростатические препятствия, стимулируя связывание с ДНК.

В данной работе нами изучено влияние локальной замены заряда в RBM-B на взаимодействие PrimPol с ДНК и RPA. С этой целью мы дополнительно ввели (замена V546E) или убрали (замена D547H) отрицательный заряд в RBM-B PrimPol и охарактеризовали мутантные варианты биохимически. Выбранные остатки расположены в мотиве RBM-B PrimPol рядом с остатком Glu548, участвующим в электростатическом взаимодействии с остатком Arg91 субъединицы RPA70 [9]. Полученные данные указывают на то, что локальное изменение заряда одного аминокислотного

остатка RBM-B не вносит значимого вклада в связывание PrimPol с ДНК и RPA.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Экспрессия и очистка белков.** Мутантные варианты PrimPol человека получены с помощью сайт-направленного мутагенеза (приложение 1, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте [http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp\\_Manukyan\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2024/5/supp_Manukyan_rus.pdf)). PrimPol дикого типа и мутантные варианты, слитые на N-конце с GST-тагом, экспрессировали в клетках *Escherichia coli* (штамм Rosetta 2) и очищали согласно [25]. Белок RPA получен по протоколу, описанному ранее [26].

**ДНК-олигонуклеотидные субстраты.** Немеченые праймеры и ДНК-матрицы синтезированы компанией “Евроген” (Москва, Россия). Олигонуклеотид р-р-р-12, содержащий 5'-концевой аденозинтрифосфат, синтезировали ферментативно, как описано ранее [24]. Для получения ДНК-субстрата для тестирования ДНК-полимеразной активности Primer-18 метили по 5'-концу [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ с помощью полинуклеотидкиназы Т4 (“СибЭнзайм”, Россия) и отжигали с Template-55 в молярном соотношении 1:1.1, нагревая до 75°C и медленно охлаждая до комнатной температуры. Для получения ДНК-субстрата для анализа связывания PrimPol с ДНК праймер р-р-р-12 отжигали с Template-ACCTG в молярном соотношении 1:1.1, нагревая до 75°C и медленно охлаждая до комнатной температуры. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, представлены в табл. 1.

**Реакции удлинения праймера.** Реакции удлинения праймера проводили в реакционных смесях объемом 20 мкл, содержащих 40 мМ Hepes (pH 7.0), 8% глицерина, 0.1 мг/мл БСА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 нМ ДНК-субстрата праймер: матрица, 200 мкМ dNTP и 100–800 нМ PrimPol. Реакции инициировали добавлением dNTP и инкубировали (время инкубации указано в подписях к рисункам) при 37°C. Реакции останавливали, добавляя 20 мкл буфера для нанесения на гель, содержащего 95% формамида, 10 мМ EDTA и 0.1% бромфенолового синего. Продукты синтеза ДНК разделяли в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины, и визуализировали на приборе Typhoon 9400 (“GE Healthcare”, США). Эксперименты повторяли 3 раза. Определяли процент удлинения праймера для каждой реакции (от всех полос синтеза ДНК). Средние значения и стандартные ошибки указаны на графиках и диаграммах.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

| Название           | Нуклеотидная последовательность                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------|
| Primer-18          | 5'-CGGTATCCACCAGGTCTG                                      |
| Template-55        | 5'-GACTACATTTTCATCTGGCTTGGGCTTCATCGTTGTCGACACCTGGTGGATACCG |
| Primer-32          | 5'-ACGATGAAGCCCAAGCCAGATGAAATGTAGTC                        |
| Template-ACCTG     | 5'-AAAAAAAAAACCTGAAAAAAAAA                                 |
| Template-ACCTG-55  | 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTGAAAAAAAAA         |
| p-p-p-12           | 5'-ppp-AGGTTTTTTTTT                                        |
| Template-ACCTG-Cy5 | 5'-Cy-5-AAAAAAAAAACCTGAAAAAAAAA                            |

**Расчет наблюдаемой константы полимеризации.** Для определения скорости синтеза ДНК реакции удлинения праймера останавливали через различные промежутки времени (2–120 мин, как указано в подписях к рисункам). Реакционные смеси содержали 20 нМ ДНК-субстрата праймер:матрица, 200 мкМ PrimPol, 200 мкМ dNTP, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Расчет параметра  $k_{obs}$  кинетики удлинения праймера проводили по экспоненциальному уравнению:  $A = A_{max} \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)]$  с использованием нелинейной регрессии, где  $A$  – эффективность удлинения праймера (наблюдаемый % удлинения праймера),  $A_{max}$  – максимальное удлинение праймера,  $k_{obs}$  – наблюдаемая константа удлинения праймера первого порядка,  $t$  – время реакции. Расчеты проводили в программе GraphPad Prism 8. Эксперименты повторяли 3 раза.

**Синтез ДНК *de novo*.** ДНК-праймазную активность PrimPol тестировали в реакционной смеси объемом 6 мкл, содержащей 40 мМ Hepes (pH 7.0), 8% глицерина, 0.1 мг/мл БСА, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 2 мкМ немеченой матрицы ACCTG, по 200 мкМ dGTP, dCTP, dTTP или только dGTP, 10 мкМ ATP, 30 нМ [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP и 2 мкМ PrimPol. Реакции инициировали добавлением dNTP и инкубировали при 30°C в течение времени, указанного на рисунках. Реакции останавливали, добавляя равный объем буфера для нанесения на гель. Продукты синтеза ДНК разделяли в 30%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, и визуализировали на приборе Typhoon 9400 (“GE Healthcare”). Эксперименты повторяли 3 раза.

**Анализ подвижности комплекса в нативном геле.** Связывание PrimPol с ДНК-субстратом, состоящим из праймера p-p-p-12, отожженного на Template-ACCTG-Cy-5, проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 40 мМ Hepes (pH 7.0), 50 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 5% глицерина,

0.1 мг/мл БСА, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 100 нМ ДНК-субстрата и 300–3000 нМ PrimPol. Смеси инкубировали при 24°C в течение 20 мин.

Чтобы проанализировать влияние замен на взаимодействие PrimPol с RPA, 25 нМ RPA преинкубировали с 50 нМ <sup>32</sup>P-меченой матрицей ACCTG-55 при 8°C в течение 30 мин. Затем добавляли 300–3000 нМ PrimPol, 200 мкМ dNTP и инкубировали в течение еще 30 мин при 8°C. Смеси наносили на 5%-ный нативный ПААГ. Комплексы отделяли от свободной ДНК в 0.5× Трис-глициновом буфере (12.5 мМ Трис, 96 мМ глицин, pH 8.3) при 10 В/см и 4°C. Гель визуализировали на приборе Typhoon 9400 (“GE Healthcare”). Эксперименты повторяли 3 раза.

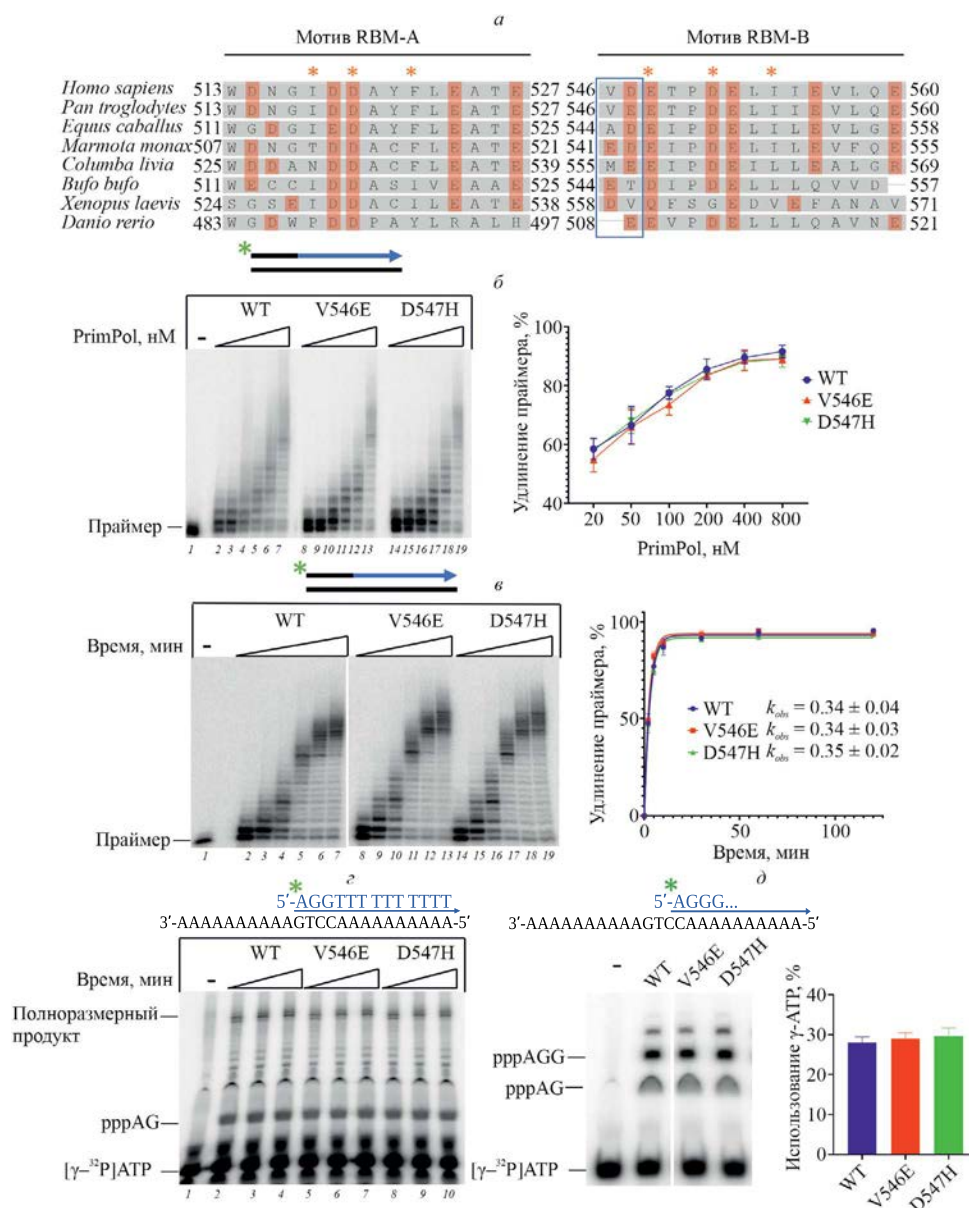
**Соосаждение белков.** Для анализа физического взаимодействия RPA и PrimPol проводили соосаждение белков. Праймазуполимеразу PrimPol, слитую с GST-тагом на N-конце, экспрессировали в 500 мл культуры *E. coli* и иммобилизовали на GST-сефарозе. Связывание иммобилизованной PrimPol с RPA проводили в реакциях объемом 500 мкл, содержащих 30 мМ Hepes (pH 7.0 или 7.4), 5% глицерина, 150 мМ KCl, 0.05% NP40, 1 мМ ДТТ, 20 мкл GST-сефарозы с GST-PrimPol, 100 нМ RPA, в течение 60 мин при 4°C и слабым перемешивании. Сорбент осаждали центрифугированием (500 об/мин, 4°C, 3 мин), буфер отбирали. Сорбент промывали 3 раза: 1 раз буфером для связывания (150 мМ KCl) и 2 раза буфером, содержащим 600 мМ KCl. Затем к сорбенту добавляли 30 мкл буфера для связывания и 8 мкл буфера для нанесения на гель, содержащего 32 мМ Трис, 1% сульфододецилсульфата натрия (SDS), 3% глицерина, 1 мМ EDTA, 50 мМ ДТТ и 0.1% бромфенолового синего. Пробы прогревали (95°C, 10 мин) и разделяли в денатурирующем 13%-ном SDS-ПААГ. Гель окрашивали коллоидным раствором Coomassie Brilliant Blue G-250.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Варианты *PrimPol V546E* и *D547H*  
не отличаются от белка дикого типа  
по уровню каталитической активности

Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что RBM-A и RBM-B содержат по 5–6 отрицательно заряженных

остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (рис. 1а). Одновременная замена нескольких отрицательно заряженных остатков может вызвать значительный неспецифический негативный эффект на фолдинг белка, тогда как потеря или добавление одного остатка с меньшей вероятностью приведет к резкому нарушению структуры, но может повлиять на взаимодействие *PrimPol* с ДНК и/или RPA. Для



**Рис. 1.** Сравнение каталитической активности *PrimPol* дикого типа и вариантов V546E и D547H. **а** — Выравнивание аминокислотных последовательностей RBM-A и RBM-B *PrimPol* из организмов разных таксонов. Красным отмечены отрицательно заряженные остатки Asp и Glu. Оранжевыми звездами отмечены остатки *PrimPol*, образующие связи с субъединицей RPA70, согласно структуре [9]. **б** — ДНК-полимеразная активность *PrimPol* и вариантов с заменами V546E и D547H. Реакции проводили в присутствии 20/50/100/200/400/800 нМ *PrimPol* в течение 10 мин. **в** — ДНК-полимеразная активность *PrimPol* и ее вариантов в зависимости от времени реакции, а также значения параметра  $k_{obs}$ . Реакции проводили в присутствии 200 нМ *PrimPol* в течение 2/5/10/30/60/120 мин. **г** — Общая ДНК-праймазная активность *PrimPol* и вариантов с заменами V546E и D547H. Реакции проводили в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , ATP, dGTP и dTTP в течение 30/60/90 мин. **д** — Образование динуклеотида *PrimPol* дикого типа и вариантами V546E и D547H. Реакции проводили в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , ATP и dGTP в течение 30 мин.

анализа были выбраны остатки Val546 и Asp547, расположенные в мотиве RBM-B PrimPol рядом с Glu548, который участвует в электростатическом взаимодействии с остатком Arg91 субъединицы RPA70 и является одним из самых важных остатков, стабилизирующих взаимодействие PrimPol-RPA [1, 9, 10]. Интересно отметить, что в положениях 546 и 547 RBM-B у разных организмов могут находиться остатки, отличные от Val546 и Asp547 в PrimPol человека (рис. 1а). Вместо Val546 у некоторых организмов встречается дополнительный отрицательно заряженный остаток Glu, а вместо Asp547 — Val. Мы получили варианты PrimPol человека с заменами V546E и D547H и исследовали их праймазную и ДНК-полимеразную активности, а также взаимодействие с ДНК и RPA. Варианты PrimPol человека получены с помощью сайтно-направленного мутагенеза, экспрессированы и выделены из клеток *E. coli* (приложение 2, см. электронное приложение).

ДНК-полимеразную активность исследовали с помощью анализа реакций удлинения меченого праймера на дцДНК-субстрате праймер:матрица в присутствии dNTP. Об активности фермента судили по удлинению меченого праймера (%) и по длине продуктов синтеза ДНК. Активность вариантов PrimPol и белка дикого типа сравнивали в реакциях с возрастающей концентрацией фермента (20–800 нМ, 10 мин). Сравнительное тестирование показало, что варианты V546E и D547H PrimPol имеют такой же уровень ДНК-полимеразной активности, как белок дикого типа (рис. 1б, дорожки 8–13 и 14–19). Анализ кинетики ДНК-полимеразных реакций (время реакции 2–120 мин) также показал, что варианты PrimPol имеют такую

же скорость катализа, как и белок дикого типа (рис. 1в, дорожки 8–13 и 14–19).

Исследование ДНК-праймазной активности проводили на оцДНК-субстрате, содержащем сайт связывания праймаз GTCC, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР в качестве инициаторного нуклеотида и АТР/dGTP/dTTP или АТР/dGTP для анализа общей праймазной активности и образования динуклеотида соответственно. ДНК-праймазная активность вариантов V546E и D547H PrimPol также не отличалась от активности фермента дикого типа, что выражалось в одинаковой эффективности синтеза полноразмерного ДНК-продукта (рис. 1г) и одинаковой эффективности синтеза первого динуклеотида при синтезе ДНК *de novo* (рис. 1д). Таким образом, каталитическая активность вариантов PrimPol с заменами V546E и D547H не отличалась от активности PrimPol дикого типа.

#### Замены V546E и D547H в RBM-B PrimPol не влияют на взаимодействие PrimPol с ДНК и RPA

Способность к связыванию ДНК и RPA PrimPol дикого типа и ее вариантов исследовали с помощью анализа сдвига комплекса белок:ДНК в 5%-ном нативном геле.

При анализе связывания с ДНК использовали дцДНК-субстрат, в котором праймер несет 5'-концевой аденозинтрифосфат, необходимый для стабилизации С-концевого мотива ZnFn. Замены V546E и D547H не оказали влияния на связывание PrimPol с ДНК (рис. 2, дорожки 5–10). Комплексы PrimPol:ДНК с одинаковой

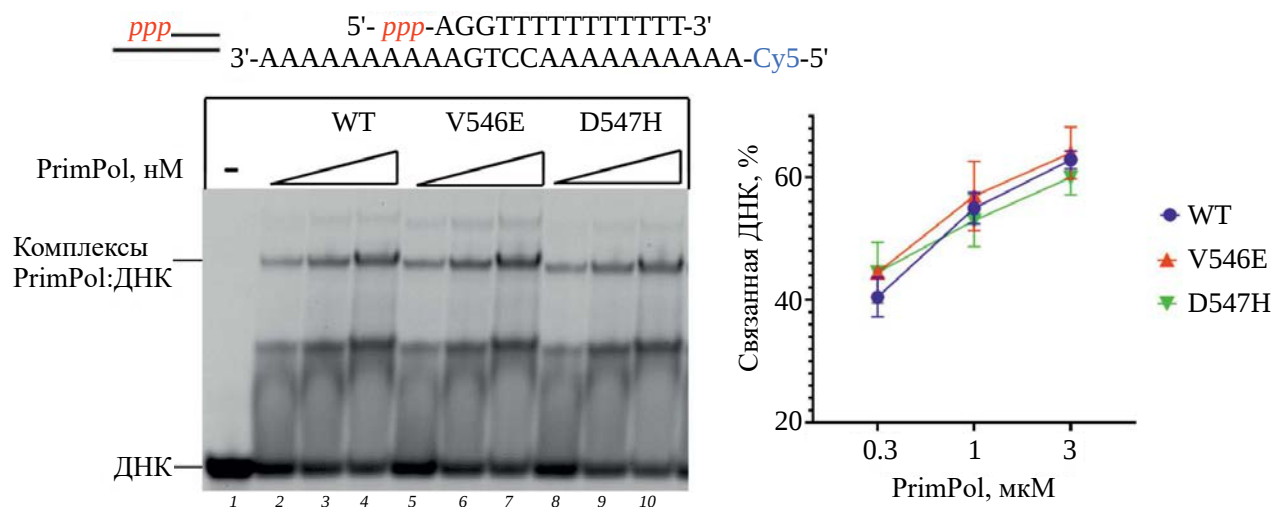
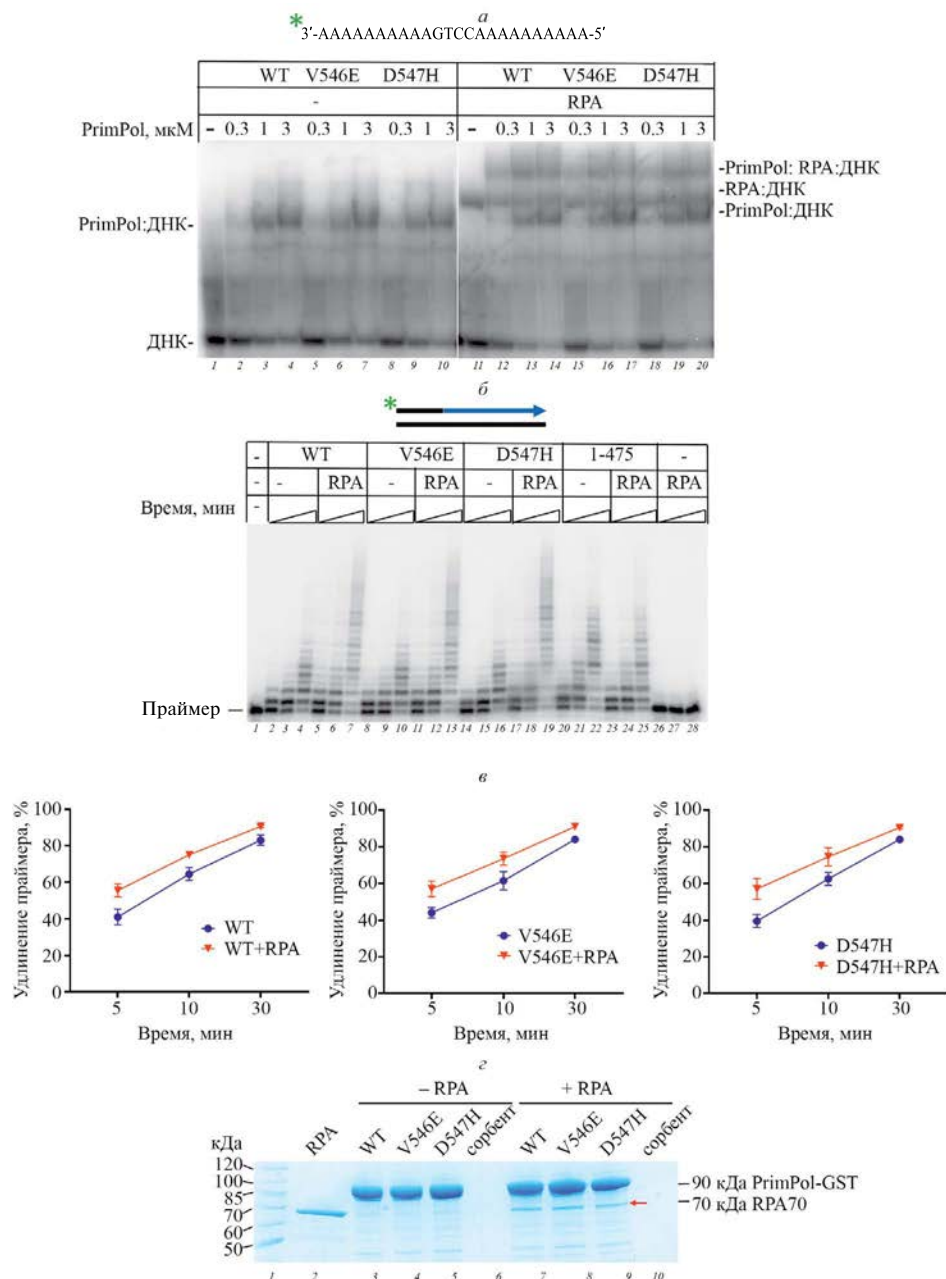


Рис. 2. Анализ сдвига комплекса PrimPol дикого типа и вариантов с заменами V546E и D547H с ДНК в нативном геле. Представлены средние значения и стандартные ошибки.

эффективностью образовывали PrimPol дикого типа и варианты с заменами V546E и D547H.

Влияние замен на взаимодействие PrimPol с RPA определяли, анализируя образование тройного комплекса RPA:ДНК:PrimPol (рис. 3а). В этом эксперименте использовали дцДНК-субстрат с выступающим одноцепочечным участком и праймером, не содержащим 5'-конце-

вую трифосфатную группу, но в присутствии dNTP в реакции. PrimPol добавляли к ДНК, прединкубированной с RPA. На данном ДНК-субстрате мутации V546E и D547H также не оказали влияния на связывание PrimPol с ДНК (рис. 3а, левая панель). Наконец, анализ образования тройного комплекса RPA:ДНК:PrimPol в нативном геле также подтвердил отсутствие влияния замен V546E и D547H на



**Рис. 3.** Анализ влияния замен V546E и D547H на взаимодействие PrimPol с репликативным белком RPA. *а* — Образование тройного комплекса RPA:ДНК:PrimPol в 5%-ном нативном геле. *б* — Электрофореграмма реакций удлинения праймера. ДНК-полимеразные реакции проводили в присутствии 100 нМ PrimPol или ее вариантов в течение 5/10/30 мин. *в* — Графики, отражающие эффективность удлинения праймера в зависимости от времени реакции. Представлены средние значения и стандартные ошибки. *г* — Соосаждение PrimPol дикого типа и вариантов V546E и D547H с белком RPA. Красной стрелкой обозначено положение полосы субъединицы RPA70, образовавшей комплекс с GST-PrimPol.

взаимодействие PrimPol с RPA. PrimPol дикого типа и ее варианты с высокой эффективностью образовывали комплекс с RPA на ДНК (рис. 3а, дорожки 12–20). Эффективное связывание RPA вариантами PrimPol с заменами V546E и D547H показано также с помощью соосаждения RPA на сорбенте с иммобилизованной GST-PrimPol (рис. 3г, дорожки 7–9).

Влияние замен V546E и D547H на стимуляцию ДНК-полимеразной активности PrimPol белком RPA изучали с помощью реакций удлинения праймера в присутствии или в отсутствие RPA (рис. 3б, в дорожки 2–19). Тестирование ДНК-полимеразной активности PrimPol показало, что RPA одинаково стимулирует активность PrimPol дикого типа и вариантов с заменами V546E и D547H (рис. 3б, в). Изменение эффективности стимуляции активности мутантных вариантов PrimPol белком RPA не обнаружено также и при анализе активности PrimPol по вытеснению цепи ДНК (приложение 3, см. электронное приложение).

Таким образом, замены V546E и D547H не влияют на взаимодействие PrimPol с RPA, и активность вариантов с этими заменами не отличается от активности белка дикого типа.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

RPA является ключевым белком-регулятором активности PrimPol [8, 10, 24, 27]. RPA стимулирует каталитическую активность PrimPol [9, 10, 24, 28, 29] и участвует в привлечении PrimPol к сайтам повреждений геномной ДНК в клетках после УФ-облучения [9]. Мутации RBM приводят к снижению эффективности взаимодействия PrimPol и RPA и блокируют привлечение PrimPol к участкам повреждений ДНК [9, 24]. При этом делеция RBM резко повышает как аффинность PrimPol к ДНК, так и каталитическую активность фермента независимо от наличия RPA [24].

Структурные исследования RBM (остатки Asp519, Ile517 и Phe522 RBM-A и остатки Asp551, Glu548 и Ile554 RBM-B) в комплексе с RPA70 показали, что во взаимодействии PrimPol с RPA важную роль играют электростатические взаимодействия между отрицательно заряженными остатками RBM PrimPol и положительно заряженными остатками субъединицы RPA70N [9]. Однако молекулярный механизм RBM-опосредованной регуляции активности PrimPol белком RPA не до конца ясен, поскольку не расшифрована полноразмерная структура PrimPol. Как делеция RBM, так и взаимодействие RBM с RPA могут, предположительно, приводить к существенным конформационным перестройкам молекулы

PrimPol. Нейтрализация отрицательного заряда RBM при связывании с RPA также может вносить вклад в достижение каталитически активного состояния. С целью проверки этой гипотезы мы изучили влияние локального изменения заряда RBM-B PrimPol на взаимодействие с ДНК и RPA. Для анализа были выбраны остатки Val546 и Asp547, расположенные в RBM-B-мотиве PrimPol рядом с остатком Glu548, который участвует в электростатическом взаимодействии с остатком Arg91 субъединицы RPA70 и является одним из ключевых остатков, стабилизирующих взаимодействие PrimPol-RPA [1, 9, 10]. Для локального изменения заряда добавляли дополнительный отрицательный остаток (замена V546E) или заменяли отрицательно заряженный остаток положительным гистидином (замена D547H). Теоретическая расчетная изоэлектрическая точка (pI) интактного RBM-B составляла 3.354, введение замены V546E снизило данное значение до 3.282, а введение замены D547H повысило pI до 3.807.

Варианты PrimPol V546E и D547H не отличаются от белка дикого типа ни по уровню ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностей, ни по эффективности связывания ДНК и RPA. Таким образом, несмотря на то что удаление всего RBM приводит к повышению каталитической активности PrimPol и ее аффинности к ДНК [24], локальное изменение заряда RBM-B не влияет на свойства фермента. Полученные данные могут быть важны для предсказания эффекта отдельных эволюционных замен или клинических мутаций отрицательно заряженных остатков RBM PrimPol. Вклад отрицательного заряда в механизм регуляции связывания PrimPol с ДНК требует дополнительной проверки с помощью замен большего количества остатков RBM.

Авторы выражают благодарность А.Г. Барановскому (Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, Omaha, США) за полезные советы при подготовке публикации. Работа частично выполнена на оборудовании ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии “Молбиотех” НИЦ “Курчатовский институт”.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №22-24-20150, Болдинова Е.О.).

Работа выполнена без привлечения животных или биологических материалов, полученных от людей, в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. García-Gómez S., Reyes A., Martínez-Jiménez M.I., Chocrón S., Mourón S., Terrados G., Powell C., Salido E., Méndez J., Holt I.J., Blanco L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Mol. Cell.* **52**, 541–553.
2. Bianchi J., Rudd S.G., Jozwiakowski S.K., Bailey L.J., Soura V., Taylor E., Stevanovic I., Green A.J., Stracker T.H., Lindsay H.D., Doherty A.J. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication. *Mol. Cell.* **52**, 566–573.
3. Wan L., Lou J., Xia Y., Su B., Liu T., Cui J., Sun Y., Lou H., Huang J. (2013) HPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity. *EMBO Rep.* **14**, 1104–1112.
4. Iyer L.M., Koonin E.V., Leipe D.D., Aravind L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucl. Acids Res.* **33**, 3875–3896.
5. Martínez-Jiménez M.I., Calvo P.A., García-Gómez S., Guerra-González S., Blanco L. (2018) The Zn-finger domain of human PrimPol is required to stabilize the initiating nucleotide during DNA priming. *Nucl. Acids Res.* **46**, 4138–4151.
6. Schiavone D., Jozwiakowski S.K., Romanello M., Guilbaud G., Guillian T.A., Bailey L.J., Sale J.E., Doherty A.J. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells. *Mol. Cell.* **61**, 161–169.
7. Mehta K.P.M., Thada V., Zhao R., Krishnamoorthy A., Leser M., Rose K.L., Cortez D. (2022) CHK1 phosphorylates PRIMPOL to promote replication stress tolerance. *Sci. Adv.* **8**, eabm0314.
8. Guillian T.A., Jozwiakowski S.K., Ehlinger A., Barnes R.P., Rudd S.G., Bailey L.J., Skehel J.M., Eckert K.A., Chazin W.J., Doherty A.J. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins. *Nucl. Acids Res.* **43**, 1056–1068.
9. Guillian T.A., Brissett N.C., Ehlinger A., Keen B.A., Kolesar P., Taylor E., Bailey L.J., Lindsay H.D., Chazin W.J., Doherty A.J. (2017) Molecular basis for PrimPol recruitment to replication forks by RPA. *Nat. Commun.* **8**, 15222.
10. Martínez-Jiménez M.I., Lahera A., Blanco L. (2017) Human PrimPol activity is enhanced by RPA. *Sci. Rep.* **7**, 783.
11. Bailey L.J., Bianchi J., Hégarat N., Hochegger H., Doherty A.J. (2016) PrimPol-deficient cells exhibit a pronounced G2 checkpoint response following UV damage. *Cell Cycle.* **15**, 908–918.
12. Bailey L.J., Bianchi J., Doherty A.J. (2019) PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells. *Nucl. Acids Res.* **47**, 4026–4038.
13. Kobayashi K., Guillian T.A., Tsuda M., Yamamoto J., Bailey L.J., Iwai S., Takeda S., Doherty A.J., Hirota K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle.* **15**, 1997–2008.
14. Mourón S., Rodriguez-Acebes S., Martínez-Jiménez M.I., García-Gómez S., Chocrón S., Blanco L., Méndez J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1383–1389.
15. Zhao F., Wu J., Xue A., Su Y., Wang X., Lu X., Zhou Z., Qu J., Zhou X. (2013) Exome sequencing reveals CCDC111 mutation associated with high myopia. *Hum. Genet.* **132**, 913–921.
16. Keen B.A., Bailey L.J., Jozwiakowski S.K., Doherty A.J. (2014) Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect. *Nucl. Acids Res.* **42**, 12102–12111.
17. Kasamo K., Nakamura M., Daimou Y., Sano A. (2020) A PRIMPOL mutation and variants in multiple genes may contribute to phenotypes in a familial case with chronic progressive external ophthalmoplegia symptoms. *Neurosci. Res.* **157**, 58–63.
18. Yuan H., Wang Q., Li Y., Cheng S., Liu J., Liu Y. (2020) Concurrent pathogenic variants in SLC6A1/NOTCH1/PRIMPOL genes in a Chinese patient with myoclonic-atonic epilepsy, mild aortic valve stenosis and high myopia. *BMC Med. Genet.* **21**, 93.
19. Duong V.N., Zhou L., Martínez-Jiménez M.I., He L., Cosme M., Blanco L., Paintsil E., Anderson K.S. (2020) Identifying the role of PrimPol in TDF-induced toxicity and implications of its loss of function mutation in an HIV+patient. *Sci. Rep.* **10**, 9343.
20. Díaz-Talavera A., Calvo P.A., González-Acosta D., Díaz M., Sastre-Moreno G., Blanco-Franco L., Guerra S., Martínez-Jiménez M.I., Méndez J., Blanco L. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol. *Sci. Rep.* **9**, 1121.
21. Quinet A., Tirman S., Jackson J., Šviković S., Lemaçon D., Carvajal-Maldonado D., González-Acosta D., Vessoni A.T., Cybulla E., Wood M., Tavis S., Batista L.F.Z., Méndez J., Sale J.E., Vindigni A. (2019) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells. *Mol. Cell* **77**, 461–474.
22. Keen B.A., Jozwiakowski S.K., Bailey L.J., Bianchi J., Doherty A.J. (2014) Molecular dissection of the domain architecture and catalytic activities of human PrimPol. *Nucl. Acids Res.* **42**, 5830–5845.
23. Rechakoblit O., Gupta Y.K., Malik R., Rajashankar K.R., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A.K. (2016) Structure and mechanism of

- human PrimPol, a DNA polymerase with primase activity. *Sci. Adv.* **2**, e1601317.
24. Boldinova E.O., Baranovskiy A.G., Gagarinskaya D.I., Manukyan A.A., Makarova A.V., Tahirov T.H. (2023) The role of catalytic and regulatory domains of human PrimPol in DNA binding and synthesis. *Nucl. Acids Res.* **51**, 7541–7551.
  25. Boldinova E.O., Stojkovic G., Khairullin R., Wanrooij S., Makarova A.V. (2017) Optimization of the expression, purification and polymerase activity reaction conditions of recombinant human PrimPol. *PLoS One*. **12**, e0184489.
  26. Binz S.K., Dickson A.M., Haring S.J., Wold M.S. (2006) Functional assays for replication protein A (RPA). *Methods Enzymol.* **409**, 11–18.
  27. Болдинова Е.О., Макарова А.В. (2023) Регуляция ДНК-праймазы-полимеразы PrimPol человека. *Биохимия*. **88**, 1392–1411.
  28. Boldinova E.O., Belousova E.A., Gagarinskaya D.I., Maltseva E.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I., Makarova A.V. (2020) Strand displacement activity of primpol. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9027.
  29. Boldinova E.O., Ghodke P.P., Sudhakar S., Mishra V.K., Manukyan A.A., Miropolskaya N., Pradeepkumar P.I., Makarova A.V. (2022) Translesion synthesis across the N2-ethyl-deoxyguanosine adduct by human PrimPol. *ACS Chem. Biol.* **17**, 3238–3250.
  30. Liu H., Naismith J.H. (2008) An efficient one-step plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* **8**, 91.

## Point Mutations V546E and D547H of the RBM-B Motif Does Not Affect the Binding of PrimPol to RPA and DNA

A. A. Manukyan<sup>1</sup>, A. V. Makarova<sup>1, 2</sup>, E. O. Boldinova<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>2</sup>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: lizaboldinova@yandex.ru

The human primase-polymerase PrimPol is a key participant of the mechanism of DNA synthesis restart during replication fork stalling at DNA damaged sites. PrimPol has a DNA primase activity and synthesizes DNA primers that are used by processive DNA polymerases to continue replication. Recruitment of PrimPol to the sites of DNA damage, as well as catalytic activity stimulation depends on interaction with the replicative protein RPA, which binds single-stranded DNA. The C-terminal domain of PrimPol contains a negatively charged RPA-binding motif (RBM), which mutations disrupt the interaction between two proteins. The RBM motif also plays a role in the negative regulation of PrimPol interaction with DNA. Deletion of RBM dramatically increases PrimPol affinity to DNA and stimulates PrimPol activity. The mechanism of RBM-mediated regulation of PrimPol activity is unclear. The relatively strong negative charge of RBM potentially may contribute to the interaction of PrimPol with RPA and DNA. RBM contains two negatively charged regions RBM-A and RBM-B. In this work, we additionally added (substitution V546E) or decreased (substitution D547H) the negative charge in RBM-B PrimPol and characterized these mutant variants biochemically. It was shown that the local change of RBM-B charge has no effect on the interaction of PrimPol with DNA and RPA, as well as the catalytic activity of the enzyme.

**Keywords:** primase-polymerase PrimPol, DNA synthesis restart, replication, RPA

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
№ 0110239 от 8 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

---

Подписано к печати 99.99.2024 г. Дата выхода в свет 99.99.2024 г. Формат 60 × 88 <sup>1</sup>/<sub>8</sub> Усл. печ. л. 99,99 Уч.-изд. 99,99 л.  
Тираж экз. Зак. Цена свободная

---

Учредители: Российская академия наук, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

---

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14  
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.  
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

**Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке**

- Автоматика и телемеханика  
 Агрохимия  
 Азия и Африка сегодня  
 Акустический журнал  
 Астрономический вестник. Исследования Солнечной системы  
 Астрономический журнал  
 Биологические мембраны  
 Биология внутренних вод  
 Биология моря  
 Биоорганическая химия  
 Биофизика  
 Биохимия  
 Ботанический журнал  
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук  
 Вестник древней истории  
 Вестник Российской академии наук  
 Вестник российской сельскохозяйственной науки  
 Водные ресурсы  
 Вопросы истории естествознания и техники  
 Вопросы ихтиологии  
 Вопросы языкознания  
 Вулканология и сейсмология  
 Высокомолекулярные соединения. Серия А  
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б  
 Высокомолекулярные соединения. Серия С  
 Генетика  
 Геология рудных месторождений  
 Геомагнетизм и аэрономия  
 Геоморфология и палеогеография  
 Геотектоника  
 Геохимия  
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология  
 Государство и право  
 Дефектоскопия  
 Дифференциальные уравнения  
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления  
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни  
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле  
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки  
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах  
 Журнал аналитической химии  
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова  
 Журнал вычислительной математики и математической физики  
 Журнал неорганической химии  
 Журнал общей биологии  
 Журнал общей химии  
 Журнал органической химии  
 Журнал прикладной химии  
 Журнал физической химии  
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии  
 Журнал экспериментальной и теоретической физики  
 Записки Российского минералогического общества  
 Зоологический журнал  
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа  
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела  
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая  
 Известия Российской академии наук. Серия географическая  
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка  
 Известия Российской академии наук. Серия физическая  
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления  
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана  
 Известия Российской академии наук. Энергетика  
 Известия Русского географического общества  
 Исследование Земли из космоса  
 Кинетика и катализ  
 Коллоидный журнал  
 Координационная химия  
 Космические исследования  
 Кристаллография  
 Латинская Америка  
 Лёд и Снег  
 Лесоведение  
 Литология и полезные ископаемые  
 Мембраны и мембранные технологии  
 Металлы  
 Микология и фитопатология  
 Микробиология  
 Микроэлектроника  
 Молекулярная биология  
 Нейрохимия  
 Неорганические материалы  
 Нефтехимия  
 Новая и новейшая история  
 Общественные науки и современность  
 Общество и экономика  
 Океанология  
 Онтогенез  
 Палеонтологический журнал  
 Паразитология  
 Петрология  
 Письма в Астрономический журнал  
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики  
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования  
 Почвоведение  
 Приборы и техника эксперимента  
 Прикладная биохимия и микробиология  
 Прикладная математика и механика  
 Проблемы Дальнего Востока  
 Проблемы машиностроения и надежности машин  
 Проблемы передачи информации  
 Программирование  
 Психологический журнал  
 Радиационная биология. Радиозэкология  
 Радиотехника и электроника  
 Радиохимия  
 Расплавы  
 Растительные ресурсы  
 Российская археология  
 Российская история  
 Российская сельскохозяйственная наука  
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова  
 Русская литература  
 Русская речь  
 Сенсорные системы  
 Славяноведение  
 Современная Европа  
 Социологические исследования  
 Стратиграфия. Геологическая корреляция  
 США & Канада: экономика, политика, культура  
 Теоретические основы химической технологии  
 Теплофизика высоких температур  
 Успехи современной биологии  
 Успехи физиологических наук  
 Физика Земли  
 Физика и химия стекла  
 Физика металлов и металловедение  
 Физика плазмы  
 Физикохимия поверхности и защита материалов  
 Физиология растений  
 Физиология человека  
 Химическая физика  
 Химия высоких энергий  
 Химия твердого топлива  
 Цитология  
 Человек  
 Экология  
 Экономика и математические методы  
 Электрохимия  
 Энтомологическое обозрение  
 Этнографическое обозрение  
 Ядерная физика