



# Институту биологии гена РАН – 30 лет

**Т**ридцать лет назад вышло постановление Президиума Академии наук СССР об организации Института биологии гена АН СССР. С одной стороны, сложно выбрать более неподходящее время для создания новой исследовательской организации. С другой же, периоды исторической турбулентности и созданы для рождения чего-то нового, которое, тем не менее, должно доказать свою состоятельность и жизнеспособность. Очевидно, наш Институт прошел проверку временем и сегодняшний юбилей – хороший повод подвести некоторые итоги.

Институт, фактически, был организован как точка роста для многочисленной научной школы одного из ведущих советских молекулярных биологов Георгия Павловича Георгиева. Лаборатории в новом институте возглавили непосредственные ученики Г.П. Георгиева и его ближайшие коллабораторы. То, что Институт развивался и с успехом пережил свой детский и юношеский периоды, во многом связано с неудержимой энергией Г.П. Георгиева и активной работой его ближайших помощников и ведущих завлабов. Все эти годы наш Институт менялся сообразно обстоятельствам и новым направлениям в молекулярной и клеточной биологии, но никогда не сдавал лидирующих позиций в титульной области – изучении механизмов регуляции работы генов. Несмотря на достаточно скромные размеры, наш Институт является безусловным лидером в области фундаментальных и трансляционных исследований механизмов регуляции экспрессии генов, пространственной организации генома и эпигенетики.

Действительно, наш Институт – один из самых маленьких в Российской академии наук, что, тем не менее, может рассматриваться как преимущество. Благодаря этому интенсивность межлабораторного

общения в Институте существенно выше обычного уровня, а это является залогом активного научного развития всего коллектива в целом. Тридцать лет развития – хороший срок для оценки устойчивости коллектива и с точки зрения смены поколений. Доля молодых ученых среди сотрудников Института составляет более шестидесяти процентов, при этом доля молодых ученых среди заведующих подразделениями близится к пятидесяти процентам. На наш взгляд, это достаточно уникальная ситуация, которая корнями уходит в программы поддержки новых групп Президиума РАН и соответствующую внутреннюю политику Института. Это привело также и к тому, что в Институте функционируют беспрецедентно молодые диссертационный и ученый советы. Сохранение традиций и восприимчивость к новым идеям делают наш Институт привлекательным местом работы сильных исследователей, а также способствуют преодолению возникающих трудностей.

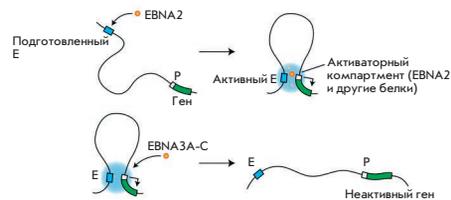
С точки зрения научных достижений за эти тридцать лет были и открытия, и пробы новых направлений исследований, статьи коллективов Института в ведущих научных журналах и многое другое. Рассказ об этом славном прошлом мало скажет нам о будущем. Поэтому, чтобы очертить, хоть и неполно, сегодняшние интересы и надежды Института, коллективы из разных лабораторий подготовили серию научных обзорных статей, которые будут опубликованы в этом и следующем номере замечательного журнала *Acta Naturae*. Мы надеемся, что эти работы будут интересны широкому кругу исследователей и помогут найти новых друзей, готовых работать вместе с нами. ●

*Искренне ваши,  
сотрудники ИБГ РАН*

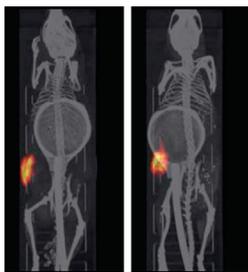
## Модификация ядерных компартментов и 3D генома в условиях вирусной инфекции

С. В. Разин, А. А. Гаврилов, О. В. Яровая

В обзоре обсуждается, как изменяется структурно-функциональная компартментализация клеточного ядра и 3D-организация клеточного генома при заражении клеток различными вирусами. Особое внимание уделено тому, как вносимые изменения способствуют реализации стратегии вируса по преодолению систем противовирусной защиты и обеспечению условий для репликации вируса.



Индукцированная вирусом реорганизация 3D генома



день 0      день 7

Визуализация удержания радиоактивности в опухоли методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии

## Доставка биологически активных веществ в ядра клеток-мишеней для целей трансляционной медицины

А. С. Соболев

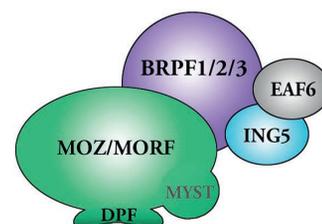
Обзор работ лаборатории автора в ИБГ РАН, позволивших создать модульные нанотранспортеры – базовую технологию, которая, обеспечивая направленную доставку противоопухолевых агентов в наиболее чувствительный компартмент клеток-мишеней, придает им высокую эффективность и клеточную специфичность и позволяет антителомиметикам проникать в нужный компартмент живых клеток. Разработаны комплексы поликатионных блок-сополимеров с ДНК, способные к преимущественной трансфекции активно делящихся клеток.

## DPF-домен как уникальная структурная единица в активации транскрипции, дифференцировке и онкотрансформации

Н. В. Сошникова, А. А. Шейнов, Е. В. Татарский, С. Г. Георгиева

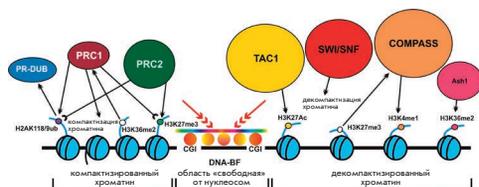
Домен DPF состоит из двух PHD-доменов, организованных в единую структуру. DPF взаимодействует с модифицированными N-концами гистонов: H3K14ac/cr, H3K9ac, находящимися в транскрипционно-активном хроматине. Белки, содержащие DPF, входят в гистон-ацетилазный комплекс MYST и хроматинремонтирующий комплекс SWI/SNF. Оба этих комплекса являются коактиваторами транскрипции генов, экспрессирующихся при развитии организма, дифференцировке и онкотрансформации клеток млекопитающих.

MOZ/MORF HAT-комплекс



Схематичное изображение белков и комплексов, содержащих DPF-домены

## Белки групп Polycomb и Trithorax: долгий путь от мутации у дрозофилы до применения в медицине



Основные активности белков групп Polycomb/Trithorax

Д. А. Четверина, Д. В. Ломаев, М. М. Ерохин

Белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG) – эволюционно консервативные факторы, отвечающие соответственно за репрессию и активацию транскрипции множества генов у дрозофилы и у млекопитающих. В обзоре рассмотрены основные комплексы белков PcG и TrxG, механизмы их действия и привлечения на хроматин. Отдельная глава посвящена нарушениям ряда факторов данных групп при онкологии и используемым подходам для создания лекарственных препаратов на основе низкомолекулярных веществ.

# Acta Naturae

ТОМ 12, № 4 (47), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2020  
издается с апреля 2009 года

## Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,  
Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики»

## Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев  
Главные редакторы: А.Г. Габитов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,  
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,  
М.В. Угрюмов

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),  
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),  
И.П. Биленкина (Москва, Россия),  
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),  
Дж. Ву (Шанхай, Китай),  
В.М. Говорун (Москва, Россия),  
С.М. Деев (Москва, Россия),  
О.А. Донцова (Москва, Россия),  
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),  
М. Зуали (Париж, Франция),  
М. Исагулянец (Стокгольм, Швеция),  
А.Л. Конов (Москва, Россия),  
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),  
П. Массон (Гренобль, Франция),  
В.О. Попов (Москва, Россия),  
И.А. Тихонович (Москва, Россия),  
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),  
А. Фрибуле (Компьень, Франция),  
В.К. Швядас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева  
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева  
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин  
Верстка: К.К. Опарин  
Корректур: Р.С. Шаймарданова  
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4  
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60  
E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
*Acta Naturae* обязательна. Любое воспроизведение опубликованных  
материалов без письменного согласия редакции не допускается.  
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,  
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2020

Номер подписан в печать 29 декабря 2020 г.  
Тираж 100 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии НИУ ВШЭ,  
г. Москва, Кочновский проезд, 3

Включен в базы данных PubMed,  
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит  
в Перечень ведущих периодических  
изданий Высшей аттестационной комиссии  
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.360

## СОДЕРЖАНИЕ

Институту биологии гена РАН — 30 лет . . . . . 1

### ОБЗОРЫ

А. П. Ковина, Н. В. Петрова, С. В. Разин,  
О. Л. Кантидзе

Роль *L*-аскорбиновой кислоты  
в эпигенетической регуляции онкогенеза  
и репрограммирования стволовых клеток . . . 5

Л. С. Мельникова, П. Г. Георгиев,  
А. К. Головнин

Функции и механизмы действия  
инсуляторов в геномах высших эукариот . . . 15

С. В. Разин, А. А. Гаврилов, О. В. Яровая  
Модификация ядерных компартментов  
и 3D генома в условиях вирусной  
инфекции . . . . . 34

А. С. Соболев

Доставка биологически активных  
веществ в ядра клеток-мишеней для целей  
трансляционной медицины . . . . . 47

Н. В. Сошникова, А. А. Шейнов,  
Е. В. Татарский, С. Г. Георгиева  
**DPF-домен как уникальная структурная  
единица в активации транскрипции,  
дифференцировке и онкотрансформации. . . 57**

Д. А. Четверина, Д. В. Ломаев, М. М. Ерохин  
**Белки групп Polyscomb и Trithorax:  
долгий путь от мутации у дрозофилы  
до применения в медицине . . . . . 66**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. Г. Андрианова, А. М. Куджаев,  
В. А. Абрикосова, А. Е. Гущина,  
И. В. Смирнов, Т. В. Ротанова  
**Участие остатков E34, K35 и R38 N-домена  
в формировании функционально активной  
структуры Lon-протеазы *Escherichia coli* . . . 86**

И. Г. Гвазава, А. В. Косых, О. С. Роговая,  
О. П. Попова, К. А. Собянин, А. К. Хрущев,  
А. В. Тимофеев, Е. А. Воротеяк  
**Упрощенная стрептозотоциновая  
модель сахарного диабета у мышей Nude . . 98**

А. Л. Зефиоров, Р. Д. Мухамедзянов,  
А. В. Захаров, К. А. Мухутдинова,  
Ю. Г. Одношвикина, А. М. Петров  
**Закисление цитоплазмы угнетает  
мобилизацию синаптических везикул  
в двигательных нервных окончаниях. . . . . 105**

Н. А. Фурсова, М. Ю. Мазина,  
Ю. В. Николенко, Н. Е. Воробьева,  
А. Н. Краснов

**Белок CG9890 дрозофилы, содержащий  
домены цинковых пальцев, локализуется  
с комплексами модификации  
и ремоделирования хроматина  
на промоторах генов и участвует  
в регуляции транскрипции . . . . . 114**

С. Н. Щелкунов, С. Н. Якубицкий, Т. В. Бауэр,  
А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев,  
И. А. Юрганова, Д. А. Одношевский,  
И. В. Колосова, С. А. Пьянков, О. С. Таранов  
**Влияние повышенной продукции внеклеточных  
вирионов вируса осповакцины на  
его свойства при инфицировании мышей. . . 120**

**Правила для авторов . . . . . 133**

GTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTTAAGCATATGC  
CTACATACTAATACACTTACAACACATACACCCCAATA  
CAACATACACTACTCCGGATGTACCCCAACAGATACCA  
GATAAGAATAAGATTGTTATATGATCCTCGAGAATGGA  
AAAAACCCCAATTGCGACGGTGAACCCACTGGTAGA  
CTAAACATCCGTCCИНСТИТУТСААТTCCTTGCTT  
AAGACCTCACCCАБИОЛОГИИCTCCCACGTTCAA  
GCTCGGAGCCGCAГЕНАCGAGTCAAAAAGTATCGA  
TTTCAATAAAACAAACTGAGTCCGAGTAAAGAGCACTTGT  
ATCCAAGAGCAAATCGTCATTAGCCCAAGAGAAACGC  
AAAGCTTTTTCTCTTTACGATCAGAATCCTAAAGTCTA  
AAGTCCATATGTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTT  
AAGCATATGCCTACATACTAATACACTTACAACACATA  
CACCCCAATACAACATACACTACTCCGGATGTACCCA  
ACAGATACCAGATAAGAATAAGATTGTTATATGATCCT  
CGAGAATGGAAAAAACCCCAATTCTAGATAAGTCACC  
CACTGGTAGACTAAACATCCGCGTCCCAATTTAACAG  
CCTCACCCCATCGTCACATTTCCACGTTCAAAGCTCG  
GAGCCGCAATCCCGAAAAACAAGTATCGATTTCAA  
TAAACAAATTATAAGA 30 лет TCTAAGAGCACTTGA  
TCCAAGAGCAAATGCACTTGAATCCAAGAGAAACGC  
AAAGCTTTTTCTCTTTACGATCAGAATCCTAAAGTCTA  
AAGTCCATATGTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTT

УДК 577.21

# Роль L-аскорбиновой кислоты в эпигенетической регуляции онкогенеза и репрограммирования стволовых клеток

А. П. Ковина, Н. В. Петрова, С. В. Разин, О. Л. Кантидзе\*

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

\*E-mail: kantidze@gmail.com

Поступила в редакцию 26.06.2020

Принята к печати 07.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11060

**РЕФЕРАТ** В последние годы появляется все больше данных о молекулярных механизмах, лежащих в основе физиологического действия L-аскорбиновой кислоты (ASC, витамин С). Наиболее важными выглядят исследования, проливающие свет на роль ASC в регуляции редокс-статуса и эпигенома живой клетки. Это связано с тем, что на основании обнаруженных механизмов работы ASC можно выработать стратегии эффективного клинического использования ASC в терапии онкологических заболеваний и регенеративной медицине. В обзоре рассмотрено, каким образом ASC может влиять на эпигенетический статус клетки и как эти возможности ASC можно использовать в терапии опухолей и репрограммировании стволовых клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** витамин С, рак, стволовые клетки, эпигенетика, хроматин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин; 5mC – 5-метилцитозин;  $\alpha$ -KG –  $\alpha$ -кетоглутарат; AML – острый миелоидный лейкоз; ASC – L-аскорбиновая кислота; BETi – бромодомен и экстратерминальные ингибиторы; DHA – дегидроаскорбиновая кислота; DNMT – ДНК-метилтрансфераза; DNMTi – ингибиторы ДНК-метилтрансфераз; GSH – глутатион; Gulo – L-гулонолактоноксидаза; IDH – изоцитратдегидрогеназа; KGDD –  $\alpha$ -KG-зависимая диоксигеназа; MEF – эмбриональные фибробласты мыши; P4H – коллаген-пролил-4-гидролаза; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; TET – Ten-Eleven Translocation диоксигеназа; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

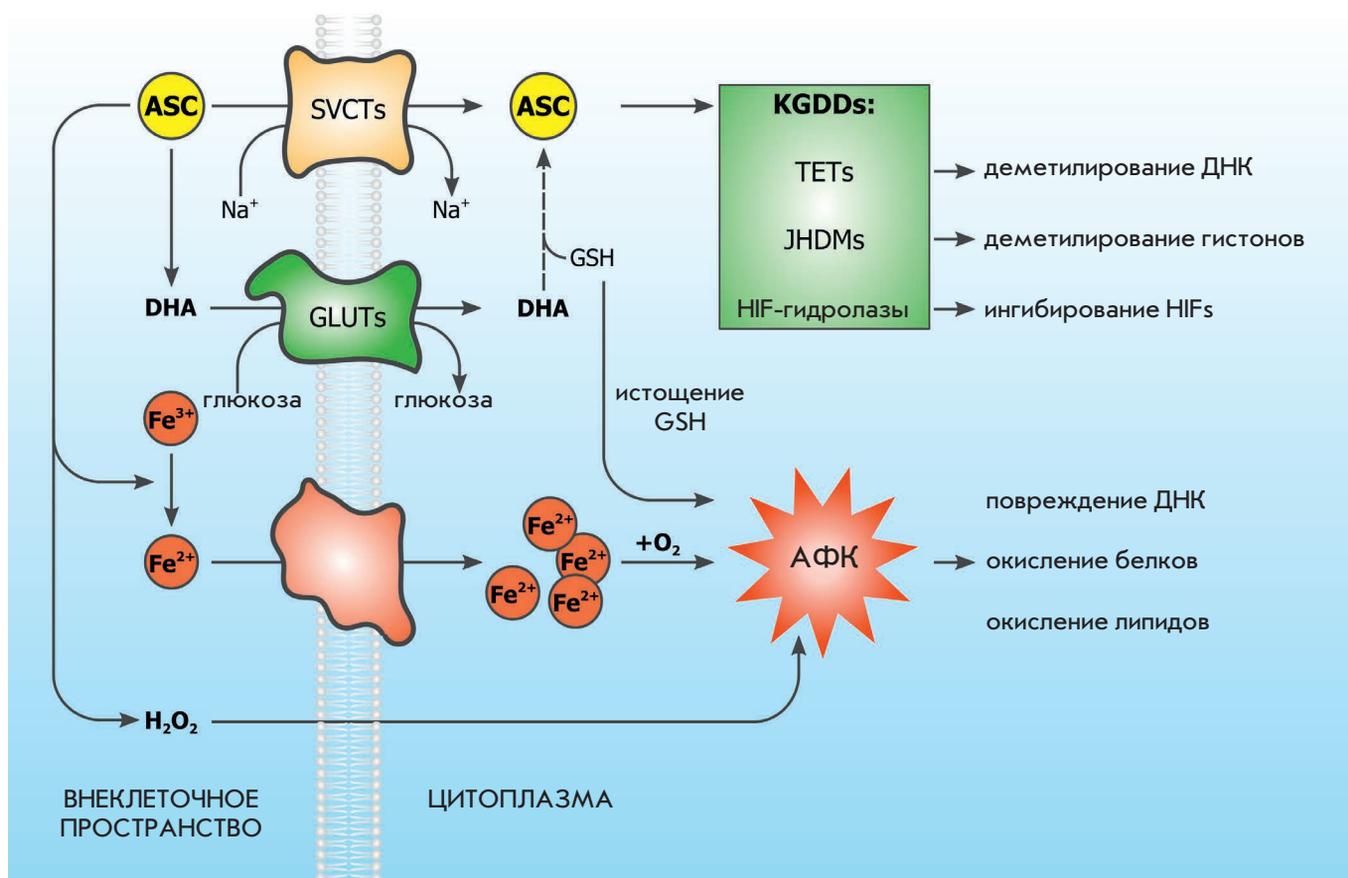
## ВВЕДЕНИЕ

L-аскорбиновая кислота (ASC, витамин С) относится к незаменимым водорастворимым витаминам. В отличие от большинства млекопитающих, приматы, морские свинки и крыланы утратили способность синтезировать ASC из-за мутации в гене L-гулонолактоноксидазе (Gulo), катализирующей последнюю стадию синтеза ASC из глюкозы [1]. Концентрация ASC в организме человека регулируется сразу несколькими механизмами, обеспечивающими его содержание в плазме не более 80 мкМ (при пероральном поступлении) [2]. При этом в большинстве клеток млекопитающих поддерживаются высокие концентрации внутриклеточного ASC, которые могут достигать 1–10 мМ. За активный транспорт ASC внутрь клеток ответственны натрийзависимые транспортеры SVCT1 и 2 (рисунки), дифференциально экспрессирующиеся в разных тканях [3].

ASC является хорошим восстановителем, т.е. донором электронов. Отдавая первый электрон, ASC превращается в аскорбильный радикал, который от-

носительно стабилен и нереактивен. При потере двух электронов в ходе двух раундов окисления ASC превращается в дегидроаскорбиновую кислоту (DHA), которая может поглощаться и секретироваться клеткой с помощью переносчиков глюкозы GLUT1, 2, 3 и 8 (рисунки) [4]. Внутри клетки DHA может быстро восстановиться до ASC, реагируя с восстановленным глутатионом (GSH) (рисунки) [4]. В плазме крови преобладает восстановленная форма ASC, а концентрация DHA находится на очень низком уровне [5].

В микромолярных концентрациях ASC может выполнять функцию антиоксиданта. ASC служит кофактором целого ряда монооксигеназ и  $\text{Fe}^{2+}$ / $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -KG)-зависимых диоксигеназ (KGDD), выступая в качестве донора электронов (рисунки) [6]. Классический пример  $\alpha$ -KG-зависимых диоксигеназ – коллаген-пролил-4-гидролаза (P4H), которая хорошо изучена благодаря тому, что при снижении ее активности развивается цинга. Накопление ионов  $\text{Fe}^{3+}$ , обусловленное действием этого фермента, приводит к подавлению активности P4H и, как след-



Роль ASC в модуляции эпигенетического и редокс-статусов клетки (подробнее см. текст). АФК – активные формы кислорода; ASC – аскорбиновая кислота; DHA – дегидроаскорбиновая кислота; GLUT – транспортеры глюкозы; GSH – глутатион; HIF – индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы; JHDM – JmjC-содержащие гистондеметилазы; KGDD – α-кетоглутарат-зависимые диоксигеназы; SVCT – транспортеры Na<sup>+</sup> и ASC; TET – диоксигеназы метилцитозина

ствие, к неполному гидроксигированию остатков пролина в молекуле коллагена, aberrантному сшиванию коллагена и развитию признаков цинги [7]. ASC обладает способностью восстанавливать окисленные ионы Fe<sup>3+</sup> до каталитически активного Fe<sup>2+</sup> и предотвращает таким образом развитие цинги. Будучи кофактором KGDD, ASC влияет на такие важные биологические функции, как синтез катехоламинов, сшивание коллагена, репарация алкилированной ДНК и деградация индуцируемого гипоксией фактора 1α (HIF-1α). Особую группу KGDD составляют ферменты, которые катализируют гидроксигирование метилированных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и метилированных гистонов. Некоторым из этих диоксигеназ ASC необходим в качестве кофактора в процессах деметилирования гистонов и ДНК. Обнаружение ASC-зависимых KGDD, участвующих в гидроксигировании метилированных оснований нуклеиновых кислот и аминокислотных остатков гистонов, свидетельствует о роли ASC в эпигенетической регуляции экспрессии генов.

### ASC И МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Метилирование цитозина по пятой позиции (5-метилцитозин, 5mC) – наиболее изученная модификация ДНК у млекопитающих, играет важную роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Метилирование CpG-нуклеотидов в промоторах обычно связано с репрессией транскрипции и участвует во многих процессах, включая инактивацию X-хромосомы и импринтинг. 5mC – это очень стабильная эпигенетическая метка, удаление которой может происходить двумя путями: пассивным и активным. При пассивном удалении происходит разбавление метки в ходе репликации ДНК в отсутствие поддерживающей ДНК-метилтрансферазы (DNMT1) [8], активное же деметилирование связано с группой ферментов Ten-Eleven Translocation (TET), включающей TET1–3 [9]. TET представляют собой Fe<sup>2+</sup>/α-KG-зависимые диоксигеназы, способные последовательно окислять 5mC до 5-гидроксиметилцитозина (5hmC), 5-формилцитозина (5fC) и 5-карбоксицитозина

зина (5саС), которые опознаются и удаляются ферментами репарации ДНК [10, 11]. В отличие от 5fС и 5саС, 5hmС относительно стабилен, он может выполнять собственную эпигенетическую функцию, так как существует группа регуляторных белков, способных к специфическому узнаванию и взаимодействию с 5hmС [10].

Поскольку известно, что ASC служит кофактором некоторых Fe<sup>2+</sup>/α-KG-зависимых диоксигеназ, предположили, что он может быть кофактором и ТЕТ-опосредованного деметилирования ДНК. Действительно, оказалось, что добавление ASC в среду культивирования вызывает деметилирование нескольких тысяч генов в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека [12]. В этой связи уместно напомнить, что ASC способствует образованию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из терминально дифференцированных клеток, которое сопровождается деметилированием всего генома [13, 14]. Показано, что *in vivo* ASC усиливает генерацию 5hmС в культивируемых клетках. Скорее всего, ASC действует в качестве кофактора ТЕТ в реакции гидроксирования 5mС [15, 16], так как добавление ASC дозозависимо увеличивает количество 5hmС в эмбриональных фибробластах мыши (MEF), и этот эффект пропадает на фоне нокаута ТЕТ. Наблюдения, указывающие на участие ASC в деметилировании ДНК, сделаны на разных типах клеток, а также с использованием модельных животных [17–19].

Интересно, что в стандартных культуральных средах ASC отсутствует, и содержание 5hmС в культивируемых клетках обычно очень мало. Добавление ASC быстро усиливает образование 5hmС [20, 21]. Это позволило предположить, что синтез белка для этого не требуется, но происходит активация уже существующих ТЕТ-диоксигеназ [16]. Опубликованы результаты и других экспериментальных работ, согласно которым ASC необходим именно в качестве кофактора ТЕТ, а не просто восстановителя. Так, добавление другого восстановителя – GSH – не изменяло уровень 5hmС; это свидетельствует о том, что влияние ASC на генерацию 5hmС нельзя отнести к его роли в качестве общего восстановителя [16]. У мышей с нокаутом гена *Gulo* (*Gulo*<sup>-/-</sup>), необходимого для биосинтеза ASC, наблюдалось снижение количества 5hmС в различных тканях [19]. Показано также, что ASC значительно повышает уровни всех продуктов окисления 5mС, в том числе 5fС и 5саС [17, 19]. ASC может влиять и непосредственно на работу белков семейства ТЕТ, взаимодействуя с С-концевым каталитическим доменом ферментов, что, вероятно, способствует их правильному сворачиванию и/или возможности повторного использования Fe<sup>2+</sup> [19].

Таким образом, получены убедительные свидетельства того, что ASC действует как кофактор ТЕТ-диоксигеназ при окислении 5mС – первого этапа процесса активного деметилирования ДНК.

### ASC И МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ

Метилирование остатков лизина и аргинина в составе гистонов является важным эпигенетическим инструментом. Если ацетилирование гистонов обычно считается активирующей модификацией, то метилирование можно рассматривать как маркер и активного (например, H3K4, H3K36 и H3K79), и неактивного (например, H3K9, H3K27 и H4K20) хроматина [22]. Как и метилирование ДНК, метилирование гистонов сначала считали необратимой посттрансляционной модификацией. В начале 2000-х годов были открыты лизинспецифичные деметилазы гистонов KDM1A (LSD1) и KDM1B (LSD2), которые способны деметилировать только моно- и ди-, но не триметилированные остатки лизина в молекуле гистона [23, 24]. Однако позднее обнаружили фермент KDM4A (JHDM3A), способный удалять и третью метильную группу с остатков лизина 9 и 36 в молекуле гистона H3 [25]. В дальнейшем нашли другие похожие ферменты, которые, как и KDM4A, содержали в своем составе домен Jumonji C (JmjC). Этот каталитический домен обеспечивает гидроксилазную активность деметилаз, необходимую для деметилирования аминокислотных остатков в составе гистонов [26]. Деметилазы с JmjC-доменом также относятся к семейству Fe<sup>2+</sup>/α-KG-зависимых диоксигеназ, общие принципы работы и кофакторы которых рассмотрены выше [25, 27].

Оказалось, что JmjC-содержащим ферментам также требуется ASC. *In vitro* ASC необходим как для KDM2A, так и для KDM3A (JHDM2A): активность этих ферментов коррелировала с количеством ASC в реакционном буфере [27], при этом KDM4A в экспериментах *in vitro* полностью терял каталитическую активность при удалении ASC из среды [25].

Изучение дифференцировки различных клеток показало, что в отсутствие ASC этот процесс существенно нарушается, что связано с неспособностью клеток контролировать уровень репрессивных модификаций гистонов. Так, по ходу эндотелиально-гемопоэтического перехода отсутствие ASC приводит к накоплению H3K27me3 в геномных локусах, важных для кроветворения [28]. Избыток ASC определяет потерю диметилирования гистона H3 по лизину 9 (H3K9me2) внутри протяженных геномных доменов в эмбриональных стволовых клетках мыши (LOCK-домены [29]), что, по-видимому, обусловлено стимуляцией работы деметилаз Kdm3a и Kdm3b [30]. Добавление ASC к Т-лимфоцитам приводит к снижению уровня H3K9me3 в *cis*-регуляторных

элементах локуса гена интерлейкина-17 (IL-17) в силу активации гистондеметилазы KDM4A и соответственно к увеличению экспрессии IL-17 [31]. Кроме того, показано, что ASC стимулирует деметилирование гистонов как на начальных этапах перепрограммирования соматических клеток в ИПСК [32], так и при переходе от пре-ИПСК к полностью перепрограммированным ИПСК [33, 34]. Все эти наблюдения позволяют полагать, что ASC является кофактором JmjC-содержащих гистондеметилаз и модулирует деметилирование гистонов, скорее всего, путем регенерации каталитически активного  $Fe^{2+}$ .

### ASC И PAK

Любые низкомолекулярные вещества, способные модифицировать эпигенетические профили, рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты. Вопрос о том, может ли ASC использоваться в качестве противоопухолевого средства, обсуждается на протяжении десятилетий. Интерес к возможному применению ASC в терапии опухолей возник еще в 1970-е годы, когда Полинг и Кэмерон сообщили о повышении выживаемости больных с терминальными стадиями рака при внутривенном введении ASC (10 г ежедневно), но впоследствии попытки повторить эти результаты не увенчались успехом [35]. Связано это было со способом доставки ASC: в более поздних исследованиях применяли пероральный прием, который не позволял достичь терапевтически значимых высоких концентраций ASC в крови [36]. Дальнейшие исследования привели к возникновению новых гипотез о возможных механизмах противоопухолевого действия ASC. Как и при использовании других химиотерапевтических средств, разные типы опухолей проявляют разную чувствительность к цитотоксичному эффекту ASC [37]. Концентрации ASC в районе 2–5 мМ уже достаточны для того, чтобы уменьшить выживаемость большинства раковых клеток, культивируемых *in vitro*, на 50%. В то же время многие нераковые клетки сохраняют нормальную жизнедеятельность при концентрациях ASC около 20 мМ [37]. Выявлена гетерогенность ответа опухолевых клеток на ASC: около 10–15% типов раковых клеток нечувствительны к ASC даже в концентрации 20 мМ.

### Возможные механизмы противоопухолевого действия ASC

Механизмы противоопухолевого действия ASC можно разделить на две группы: механизмы, влияющие на редокс-биологию; и механизмы, связанные с функцией ASC в качестве кофактора  $\alpha$ -KG-зависимых диоксигеназ (рисунк).

В первую группу входят два механизма, которые не являются взаимно исключаящими, а их совмест-

ное действие может быть причиной токсичности ASC для опухолевых клеток. Прооксидантные свойства ASC в миллимолярных (фармакологических) концентрациях могут приводить к увеличению количества нерепарируемых повреждений опухолевой клетки. ASC ускоряет  $Fe^{2+}$ -зависимую продукцию гидроксильного радикала ( $\cdot OH$ ) из  $H_2O_2$  за счет окисления ионов  $Fe^{3+}$  в ионы лабильного железа ( $Fe^{2+}$ ), тем самым непрерывно генерируя активные формы кислорода (АФК) и способствуя гибели клеток [38]. Кроме того, самопроизвольное автоокисление ASC кислородом может приводить к накоплению  $H_2O_2$ , большие концентрации которого вызывают гибель клеток (рисунк) [37, 39, 40].

Второй механизм этой группы – внеклеточное окисление ASC в DHA, которая структурно похожа на глюкозу и транспортируется в клетки через транспортеры GLUTs, что способствует увеличению внутриклеточного пула DHA. Опухолевые клетки могут транспортировать DHA внутрь клетки, где она восстанавливается до ASC, что ведет к истощению пула глутатиона, NADH- и NADPH-зависимых ферментов [4]. Это, в свою очередь, вызывает развитие окислительного стресса, инактивацию глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, ингибирует гликолиз, уровень которого повышен в опухолевых клетках, и приводит к энергетическому кризису, губительному для клеток (рисунк) [41, 42].

В качестве кофактора  $Fe^{2+}/\alpha$ -KG-зависимых диоксигеназ ASC также может существенно влиять на жизнеспособность опухолевых клеток. Индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы (HIF) увеличивают экспрессию генов, отвечающих за успешную адаптацию опухолевых клеток к гипоксии, обусловленной быстрым делением клеток и недостаточным образованием кровеносных сосудов в растущей опухоли [43]. Активность HIF контролируется HIF-гидроксилазами, которые в нормальных условиях (при нормоксии) модифицируют субъединицы этих факторов, что способствует их протеасомной деградации [44]. HIF-гидроксилазы принадлежат к семейству диоксигеназ, кофактором которых может быть ASC [45]. При дефиците ASC в клетках снижена HIF-гидроксилазная активность, а значит, увеличен уровень транскрипции HIF-факторов, особенно при легкой или умеренной гипоксии [46–48]. Эти наблюдения позволили предположить, что добавление ASC к раковым клеткам может стимулировать активность HIF-гидроксилаз и снижать активность HIF, замедляя тем самым темпы роста опухоли (рисунк) [49, 50].

В качестве кофактора ферментов семейства  $Fe^{2+}/\alpha$ -KG-зависимых диоксигеназ ASC влияет на эпигенетические изменения, которые часто нераз-

ривно связаны с развитием рака (*рисунок*). Известны важные эпигенетические изменения, характерные для онкологических заболеваний. Во-первых, одним из маркеров рака является глобальное гипометилирование ДНК, которое может активировать транскрипцию транспозонов и онкогенов, а это приводит к изменению экспрессии генов и, в дальнейшем, к онкогенезу [51]. Во-вторых, гиперметилирование промоторов генов опухолевых супрессоров. Недавно показали, что уровень гидроксиметилирования (5hmC) также может меняться при некоторых типах рака [10]. Возможности использования ASC для модуляции эпигенетического статуса опухолевых клеток подробно рассмотрены в следующем разделе.

### **Биомаркеры для использования ASC в противоопухолевой терапии**

Роли ASC в модуляции профилей метилирования ДНК и гистонов в последнее время уделяется все больше внимания в связи с тем, что ASC является кофактором ферментов, участвующих в деметилировании ДНК (TET) и гистонов (JmJc-содержащие деметилазы) [9, 52]. Изменения уровней экспрессии этих ферментов и/или мутации в них обнаружены как в различных солидных опухолях, так и при гематологических злокачественных новообразованиях. Поскольку обычно мутации затрагивают только одну копию гена, то добавление ASC может компенсировать действие этой мутации путем увеличения активности оставшегося немутантного фермента [52].

Мутации генов *TET* наблюдаются при злокачественных гематологических новообразованиях – как при миелоидных, так и при лимфоидных [53], и обычно приводят к гиперметилированию ДНК [54–56]. ASC при этом действует как эпигенетический модулятор: в опухолевых клетках, обработанных ASC, увеличивается активность TET, что приводит к деметилированию ДНК, и повышается экспрессия опухолевых генов-супрессоров, таких, например, как *Smad1* [55].

Мутации при онкологических заболеваниях часто затрагивают гены, непосредственно связанные с активностью TET. Так, изоцитратдегидрогеназы IDH1 и IDH2, которые необходимы для продукции кофактора TET  $\alpha$ -KG, часто мутированы при гематологических злокачественных новообразованиях, а также в некоторых подтипах глиом и солидных опухолей [57]. В большинстве случаев эти мутации приводят к повышенному уровню 2-гидроксиглутарата и, как следствие, к гиперметилированию ДНК и снижению уровня 5hmC. На мышечных и клеточных моделях лейкоза, вызванного мутациями в генах *TET2* или *IDH1*, проведено несколько исследований [52, 55, 58, 59]. При внутривенном введении ASC, как и при восстановлении

экспрессии *TET2*, гиперметилирование ДНК удавалось подавить либо снизить благодаря усилению деметилирования ДНК [52, 55, 59]. Интересно, что после добавления ASC клетки лейкоза становятся более чувствительными к ингибированию поли(ADP-рибоза)-полимераз (PARP), что может использоваться как эффективная комбинированная стратегия терапии онкологических заболеваний с мутациями в гене *TET* [52]. Влияние добавления ASC протестировано также на мутантных по IDH1 клетках лейкоза мышей [59]. Показано, что ASC индуцирует TET2-зависимое увеличение количества 5hmC, потерю 5mC и усиление экспрессии генов, что коррелировало с уменьшением самообновления лейкозных стволовых клеток и усилением дифференцировки в сторону зрелого миелоидного фенотипа [59]. Из этих данных можно сделать вывод, что ASC способен, по крайней мере частично, смягчать эффект потери TET и IDH.

Ткани мозга имеют самые высокие потребности во внутриклеточном ASC, так как он участвует в усилении биосинтеза норэпинефрина, выступает в роли кофактора дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, а также в качестве ингибитора поглощения глутамата в нейронах сетчатки. ASC в окисленной форме (DHA) способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться затем в стволовых клетках коры и мозжечка, нейронах и клетках нейробластомы [60, 61]. Считается, что механизм действия ASC при глиоме связан с его прооксидантными свойствами. В клинических исследованиях показано, что сочетание обычных методов лечения с внутривенным введением высоких доз ASC улучшает качество жизни пациентов с глиобластомой, повышает их общую выживаемость и останавливает прогрессирование заболевания [62, 63].

Во многих типах опухолей мутированы гены фумаратгидратазы (FH) и сукцинатдегидрогеназы (SDH) [64, 65]. Мутации в этих генах приводят к накоплению сукцината и фумарата, которые действуют как онкометаболиты, конкурентно ингибируя TET и JmJc-содержащие деметилазы гистонов, даже в присутствии стабильных уровней  $\alpha$ -KG [66]. Действительно, нокаунт *FH* или *SDH* в клетках печени мыши приводил к снижению уровня 5hmC [66]. Влияние ASC на клетки с мутациями в генах *FH* или *SDH* пока не изучено, однако можно предполагать, что усиление ферментативной активности TET или JmJc-содержащих деметилаз может оказаться достаточным для восстановления нормального эпигенетического ландшафта даже в присутствии ингибирующих онкометаболитов.

### **ASC в качестве адъювантной терапии**

Потенциальные взаимодействия между ASC и химиотерапевтическими средствами уже давно явля-

ются предметом споров [67]. В исследованиях на животных показано, что одновременное использование высоких доз ASC и различных химиотерапевтических средств приводило к снижению роста ксенотрансплантированной опухоли [68–70]. Во многих *in vivo* исследованиях показано снижение уровня общей токсичности химиотерапевтических средств при пероральном или внутривенном введении ASC [71]. Введение ASC снижало потерю лейкоцитов, потерю веса и накопление асцитов, а также гепатотоксичность, уровень окисления липидов и кардиомиопатию, вызванную химиотерапевтическими средствами [69, 72].

В клинических испытаниях с участием пациентов с онкозаболеваниями различного типа внутривенное введение больших доз ASC вместе с химиотерапевтическими средствами не имело побочных эффектов и во многих случаях приводило к улучшению состояния здоровья и качества жизни [69, 73, 74]. Часто отмечают, что комбинированная терапия с участием ASC усиливает чувствительность к определенным противоопухолевым препаратам, а значит, потенциально уменьшает необходимую дозировку и, следовательно, побочные эффекты [52, 75]. Снижение токсичности, связанной с химиотерапией, показано, например, у пациентов с раком яичников III–IV стадии, которые получали карбоплатин и паклитаксел в сочетании с высокой дозой ASC [69].

Масштабное деметилирование ДНК, наблюдаемое при добавлении ASC к линиям клеток лейкоза человека, связано с увеличением в них активности TET2 [52, 76]. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз (DNMTi), например, 5-азациитидин и децитабин, снижают aberrантное гиперметилическое ДНК благодаря подавлению активности поддерживающих и *de novo* ДНК-метилтрансфераз [77]. При синергическом действии ASC и DNMTi происходит как пассивное, так и активное деметилическое ДНК, что приводит к ингибированию пролиферации опухолевых клеток и апоптозу [76]. Результаты проведенных на сегодняшний день клинических исследований, в целом, подтверждают эффективность совместного использования ASC и DNMTi [74].

ASC усиливает цитотоксическое действие ингибитора PARP1/2 олапариба на клетки AML (острый миелоидный лейкоз) человека [52]. Возможно, в данном случае речь идет о синтетической летальности: TET-опосредованное окисление ДНК, вызванное ASC, делает клетки AML сверхчувствительными к ингибированию PARP в связи с невозможностью удаления неканонических оснований из ДНК.

ASC также повышает чувствительность клеток меланомы к ингибиторам BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif)-содержащих белков (BETi),

которые вызывают изменения уровня ацетилирования гистонов и рассматриваются как многообещающие средства для терапии онкологических заболеваний [75]. ASC усиливает эффективность BETi, уменьшая уровень ацетилирования гистона H4 путем TET-зависимого подавления экспрессии гистон-ацетилтрансферазы 1 (HAT1).

В популяции в среднем дефицит ASC встречается редко, однако он гораздо чаще наблюдается у пациентов с поздними стадиями рака [78]. У большинства пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями выявляется дефицит ASC [76, 79]. Даже при отсутствии мутаций в генах TET дефицит ASC может дополнительно ухудшать функции белков TET при подавлении прогрессии опухоли. Показано, что введение некоторых противоопухолевых препаратов, таких, как цисплатин, фторурацил, нилотиниб и интерлейкин-2, может значительно снизить уровень ASC [80, 81]. Таким образом, дефицит ASC может способствовать усилению агрессивности заболевания и повышать риск рецидива.

## ASC И РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

### ASC и эмбриональное развитие

На ранних стадиях эмбрионального развития млекопитающих происходят два раунда деметилического ДНК, осуществляемого как пассивным, так и активным образом. Сразу после оплодотворения в отцовском хроматине 5mC быстро заменяется на 5hmC путем TET3-опосредованного гидроксильирования, после чего образовавшийся 5hmC размывается при репликации ДНК имплантированных эмбрионов [82]. Это приводит к практически полному исчезновению паттерна 5mC в отцовском хроматине уже на стадии 16 клеток – метилирование сохраняется только в импринтированных геномных локусах [82, 83]. Деметилическое материнского хроматина, хотя и происходит немного позже, также опосредуется как TET3-зависимым окислением, так и пассивным деметилическим [84, 85]. После имплантации эмбриона внутренняя клеточная масса, которая и дает начало зародышу, подвергается метилированию ДНК *de novo* [86]. Вторым этапом деметилического ДНК, который включает, в том числе, деметилическое импринтированных локусов, происходит в первичных половых клетках [87, 88].

Для удовлетворения потребности клеток в TET требуется значительное количество ASC в качестве кофактора, и при его отсутствии эмбриональное развитие может быть нарушено из-за неполного деметилического ДНК, что может привести к врожденным дефектам развития. ASC необходим для TET-зависимого деметилического многих про-

моторов и активации генов зародышевой линии в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека [12, 17]. Деметилирование гистонов, опосредованное JmjC-содержащими гистондеметиلاзами, имеет решающее значение для эмбрионального развития [89–92]. Показано, что материнское и отцовское питание оказывает влияние на паттерны метилирования ДНК и гистонов в клетках потомства [93, 94]. На мышинной модели показано, что потребление ASC необходимо для правильного деметилирования ДНК и дальнейшего развития женских половых клеток у плода [95]. Дефицит ASC у матери не влияет на общее развитие плода, но приводит к уменьшению количества половых клеток, замедленному мейозу и снижению плодовитости у потомства [95]. Дефицит ASC во время беременности частично имеет те же эффекты, что и нокаут гена *TET1*.

В целом, ASC, поддерживая каталитическую активность TET и некоторых JmjC-содержащих гистондеметилаз, особенно во время эпигенетического репрограммирования, может быть необходим на ранних стадиях эмбрионального развития.

### ASC и репрограммирование соматических клеток

Возможность репрограммировать соматические клетки в ИПСК, которые в дальнейшем могут использоваться для получения различных дифференцированных клеточных популяций, является важным инструментом регенеративной медицины [96, 97]. Индукция транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус (OSKM) приводит к получению ИПСК из дифференцированных соматических клеток [96, 98, 99]. Репрограммирование происходит с низкой эффективностью из-за таких факторов, как возраст донора клеток, количество пассажей в культуре, тканевое происхождение клеток [100–102]. В основе репрограммирования лежат два основных процесса: репрессия генов дифференцировки и активация генов, которые регулируют плюрипотентность. Удаление эпигенетических модификаций в геноме соматических клеток имеет решающее значение для успешности репрограммирования [103]. Многочисленные исследования, проведенные за последнее десятилетие, показали, что добавление ASC в питательную среду культивируемых соматических клеток повышает эффективность репрограммирования, а также качество полученных ИПСК [13, 14, 34]. ASC, усиливая каталитическую активность TET и JmjC-содержащих гистондеметилаз, стимулирует деметилирование ДНК и гистонов в соматических клетках, что одновременно может приводить к активации экспрессии генов плюрипотентности и стиранию эпигенетической памяти дифференцированного состояния взрослых клеток.

В первых исследованиях ASC добавляли в культуральную среду для репрограммирования в качестве антиоксиданта для смягчения эффектов АФК, уровень которых при индуцированной экспрессии OSKM был повышен [104]. Однако ASC более эффективно усиливал пролиферацию ЭСК и генерацию ИПСК из фибробластов мыши и человека, чем другие антиоксиданты [13]. Предполагается, что ASC способствует клеточному репрограммированию благодаря усилению деметилирования гистонов, которое необходимо для экспрессии Nanog – одного из основных транскрипционных факторов [105]. Действительно, добавление ингибиторов ASC-зависимых KGDD приводило к нарушению процесса образования ИПСК из MEF [34].

Одно из препятствий для репрограммирования соматических клеток – метилирование гистона H3K9 [33]. Добавление ASC к клеткам пре-ИПСК, которые находятся в промежуточном состоянии репрограммирования, приводит к их превращению в полностью репрограммированные ИПСК [13]. Такое действие ASC может быть связано с тем, что в его присутствии эффективней происходит деметилирование гистона H3K9, ассоциированного с генами транскрипционных факторов, регулирующих плюрипотентность, что приводит к усилению их экспрессии [33]. При одновременном добавлении ASC и ингибировании H3K9-специфических метилтрансфераз эффективность процесса репрограммирования повышается [13]. Проведение полногеномного скрининга с использованием РНК-интерференции позволило идентифицировать гистондеметилазу Kdm3b (Jhdm2b) как основную мишень, которую активирует ASC в процессе репрограммирования клеток [33]. Показано также, что увеличение активности деметилаз Kdm3a/b (Jmjd1a/b) и Kdm4b/c (Jmjd2b/c) с помощью ASC в ЭСК мыши и в пре-ИПСК приводит к специфической потере H3K9me2/me3 в локусах генов, ответственных за плюрипотентность [30, 33].

Другой JmjC-содержащий фермент из группы Kdm, Kdm6a (Utx), деметилюет H3K27me3 и является важнейшим регулятором индукции плюрипотентности при перепрограммировании соматических клеток мыши и человека [106]. Добавление ASC в среду культивирования ЭСК мыши приводит к изменению распределения H3K27me3 в их геноме, причем это происходит, в основном, локус-специфически [30], причины чего еще предстоит выяснить.

Анализ изменения профилей метилированных H3K36 по ходу репрограммирования MEFs в ИПСК продемонстрировал, что ASC вызывает заметное снижение H3K36me2/3 благодаря увеличению активности гистондеметилаз Kdm2a/2b (Jhdm1a/1b) [34]. Это, в числе прочего, приводит к снижению

уровня экспрессии генов ингибиторов циклинзависимых киназ в локусе INK4/ARF и снимает ограничения с процесса репрограммирования соматических клеток [101, 107]. Известно также, что репрограммирование с использованием экспрессии Oct4 и гистондеметиلاзы KDM2B в присутствии ASC активирует экспрессию кластера микроРНК miR302/367 [34]. KDM2B снижает ASC-зависимым образом уровни метилирования H3K36, который окружает сайты связывания Oct4, находящиеся около гена miR302/367, и способствует их экспрессии [34]. Кластер miR302/367 регулирует плюрипотентность путем ингибирования экспрессии генов, важных для дифференцировки [108]. Так как эти микроРНК играют решающую роль в поддержании плюрипотентности клеток, то их экспрессия падает при дифференцировке [109]. Примечательно, что экспрессия всего кластера miR302/367 достаточна для перепрограммирования фибробластов [110].

Экспрессия генов TET играет важную роль в репрограммировании соматических клеток. Нокдаун генов TET существенно затрудняет, а в некоторых случаях и полностью предотвращает, репрограммирование MEF в ИПСК путем экспрессии OSKM [20, 111, 112]. Вполне ожидаемо, ASC увеличивает эффективность процесса репрограммирования фибробластов мыши и человека в ИПСК TET-зависимым образом [16–19]. Для более эффективного репрограммирования ИПСК мыши в состояние наивной плюрипотентности ASC может быть использована совместно с витамином А (ретиноевая кислота), который через специфические сигнальные пути активирует транскрипцию TET2 и TET3 [13, 113, 114].

Наряду с важной ролью в репрограммировании соматических клеток, ASC также необходим для поддержания пролиферации и нормального потенциала дифференцировки ЭСК, ИПСК, нейрональных стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток [115]. Скорее всего, участие ASC в предотвращении

преждевременного старения этих клеточных культур и сохранении их эпигенетической пластичности опосредуется его ролью в качестве кофактора ферментов деметилирования ДНК и гистонов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Недавние исследования значительно расширили наше понимание механизмов действия ASC, в связи с чем возникло несколько гипотез, обосновывающих возможность его использования в клинической практике. ASC можно рассматривать в качестве эпигенетического лекарства, способного снижать aberrantное гиперметилирование ДНК и гистонов, что может быть востребовано при терапии некоторых видов рака и нейродегенеративных заболеваний. Точное понимание механизмов действия ASC и проводимые сейчас клинические исследования помогут определить, пациенты с какими типами онкологических заболеваний могут извлечь выгоду из лечения высокими дозами ASC. Внутривенное введение ASC может действовать само по себе или в сочетании с различными химиотерапевтическими агентами. Доклинические и клинические исследования показывают, что токсичность и побочные эффекты химиотерапии при этом могут быть снижены без уменьшения опухолеспецифической цитотоксической активности. С другой стороны, клиническая значимость ASC связана с регенеративной медициной, в частности, с получением ИПСК из соматических клеток. Влияние ASC на репрограммирование соматических клеток убедительней всего объясняется комбинированным усилением активности ферментов, участвующих в активном деметилировании ДНК и гистонов. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-00-00098) и Российского научного фонда (грант № 19-74-10009).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Linster C.L., van Schaftingen E. // FEBS J. 2007. V. 274. № 1. P. 1–22.
- Levine M., Conry-Cantilena C., Wang Y., Welch R.W., Washko P.W., Dhariwal K.R., Park J.B., Lazarev A., Graumlich J.F., King J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 8. P. 3704–3709.
- Burzle M., Hediger M.A. // Curr. Top. Membr. 2012. V. 70. P. 357–375.
- Ferrada L., Salazar K., Nualart F. // J. Cell. Physiol. 2019. V. 234. № 11. P. 19331–19338.
- Lykkesfeldt J. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007. V. 16. № 11. P. 2513–2516.
- Young J.I., Zuchner S., Wang G. // Annu. Rev. Nutr. 2015. V. 35. P. 545–564.
- Gorres K.L., Raines R.T. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2010. V. 45. № 2. P. 106–124.
- Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M. // Cell. 2011. V. 146. № 6. P. 866–872.
- Lorsbach R.B., Moore J., Mathew S., Raimondi S.C., Mukatira S.T., Downing J.R. // Leukemia. 2003. V. 17. № 3. P. 637–641.
- Rausch C., Hastert F.D., Cardoso M.C. // J. Mol. Biol. 2019. V. 432. № 6. P. 1731–1743.
- Kantidze O.L., Razin S.V. // Cell Cycle. 2017. V. 16. № 16. P. 1499–1501.
- Chung T.L., Brena R.M., Kolle G., Grimmond S.M., Berman B.P., Laird P.W., Pera M.F., Wolvetang E.J. // Stem Cells. 2010. V. 28. № 10. P. 1848–1855.
- Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // Cell Stem Cell. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
- Stattfeld M., Apostolou E., Ferrari F., Choi J., Walsh R.M., Chen T., Ooi S.S., Kim S.Y., Bestor T.H., Shioda T., et al. // Nat. Genet. 2012. V. 44. № 4. P. 398–405.

15. Dickson K.M., Gustafson C.B., Young J.I., Zuchner S., Wang G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 439. № 4. P. 522–527.
16. Minor E.A., Court B.L., Young J.I., Wang G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 19. P. 13669–13674.
17. Blaschke K., Ebata K.T., Karimi M.M., Zepeda-Martinez J.A., Goyal P., Mahapatra S., Tam A., Laird D.J., Hirst M., Rao A., et al. // *Nature*. 2013. V. 500. № 7461. P. 222–226.
18. Chen J., Guo L., Zhang L., Wu H., Yang J., Liu H., Wang X., Hu X., Gu T., Zhou Z., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 12. P. 1504–1509.
19. Yin R., Mao S.Q., Zhao B., Chong Z., Yang Y., Zhao C., Zhang D., Huang H., Gao J., Li Z., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 28. P. 10396–10403.
20. Doege C.A., Inoue K., Yamashita T., Rhee D.B., Travis S., Fujita R., Guarnieri P., Bhagat G., Vanti W.B., Shih A., et al. // *Nature*. 2012. V. 488. № 7413. P. 652–655.
21. Koh K.P., Yabuuchi A., Rao S., Huang Y., Cunniff K., Nardone J., Laiho A., Tahiliani M., Sommer C.A., Mostoslavsky G., et al. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 8. № 2. P. 200–213.
22. Justin N., De Marco V., Aasland R., Gamblin S.J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010. V. 20. № 6. P. 730–738.
23. Metzger E., Wissmann M., Yin N., Muller J.M., Schneider R., Peters A.H., Gunther T., Buettner R., Schule R. // *Nature*. 2005. V. 437. № 7057. P. 436–439.
24. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. // *Cell*. 2004. V. 119. № 7. P. 941–953.
25. Klose R.J., Yamane K., Bae Y., Zhang D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y. // *Nature*. 2006. V. 442. № 7100. P. 312–316.
26. McDonough M.A., Loenarz C., Chowdhury R., Clifton I.J., Schofield C.J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010. V. 20. № 6. P. 659–672.
27. Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y. // *Nature*. 2006. V. 439. № 7078. P. 811–816.
28. Zhang T., Huang K., Zhu Y., Wang T., Shan Y., Long B., Li Y., Chen Q., Wang P., Zhao S., et al. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 37. P. 13657–13670.
29. Chen X., Yammine S., Shi C., Tark-Dame M., Gondor A., Ohlsson R. // *Epigenetics*. 2014. V. 9. № 11. P. 1439–1445.
30. Ebata K.T., Mesh K., Liu S., Bilenky M., Fekete A., Acker M.G., Hirst M., Garcia B.A., Ramalho-Santos M. // *Epigenetics Chromatin*. 2017. V. 10. P. 36.
31. Song M.H., Nair V.S., Oh K.I. // *BMB Rep.* 2017. V. 50. № 1. P. 49–54.
32. Tran K.A., Jackson S.A., Olufs Z.P., Zaidan N.Z., Leng N., Kendzioriski C., Roy S., Sridharan R. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6188.
33. Chen J., Liu H., Liu J., Qi J., Wei B., Yang J., Liang H., Chen Y., Chen J., Wu Y., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 1. P. 34–42.
34. Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L., Esteban M.A., Pan G., et al. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 6. P. 575–587.
35. Shenoy N., Creagan E., Witzig T., Levine M. // *Cancer Cell*. 2018. V. 34. № 5. P. 700–706.
36. Padayatty S.J., Levine M. // *Oral. Dis.* 2016. V. 22. № 6. P. 463–493.
37. Chen Q., Espey M.G., Krishna M.C., Mitchell J.B., Corpe C.P., Buettner G.R., Shacter E., Levine M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 38. P. 13604–13609.
38. Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1826. № 2. P. 443–457.
39. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Krishna M.C., Shacter E., Choyke P.L., Pooput C., Kirk K.L., Buettner G.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 21. P. 8749–8754.
40. Rawal M., Schroeder S.R., Wagner B.A., Cushing C.M., Welsh J.L., Button A.M., Du J., Sibenaller Z.A., Buettner G.R., Cullen J.J. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 16. P. 5232–5241.
41. Yun J., Mullarky E., Lu C., Bosch K.N., Kavalier A., Rivera K., Roper J., Chio I., Giannopoulou E.G., Rago C., et al. // *Science*. 2015. V. 350. № 6266. P. 1391–1396.
42. Ngo B., van Riper J.M., Cantley L.C., Yun J. // *Nat. Rev. Cancer*. 2019. V. 19. № 5. P. 271–282.
43. Semenza G.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1863. № 3. P. 382–391.
44. Campbell E.J., Vissers M.C., Bozonet S., Dyer A., Robinson B.A., Dachs G.U. // *Cancer Med.* 2015. V. 4. № 2. P. 303–314.
45. Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 11. P. 9899–9904.
46. Knowles H.J., Raval R.R., Harris A.L., Ratcliffe P.J. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 8. P. 1764–1768.
47. Kuiper C., Dachs G.U., Currie M.J., Vissers M.C. // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 69. P. 308–317.
48. Vissers M.C., Gunningham S.P., Morrison M.J., Dachs G.U., Currie M.J. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 42. № 6. P. 765–772.
49. Kuiper C., Dachs G.U., Munn D., Currie M.J., Robinson B.A., Pearson J.F., Vissers M.C. // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 10.
50. Kuiper C., Molenaar I.G., Dachs G.U., Currie M.J., Sykes P.H., Vissers M.C. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 14. P. 5749–5758.
51. Ehrlich M., Lacey M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. V. 754. P. 31–56.
52. Cimmino L., Dolgalev I., Wang Y., Yoshimi A., Martin G.H., Wang J., Ng V., Xia B., Witkowski M.T., Mitchell-Flack M., et al. // *Cell*. 2017. V. 170. № 6. P. 1079–1095.
53. Ko M., An J., Rao A. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015. V. 37. P. 91–101.
54. Odejide O., Weigert O., Lane A.A., Toscano D., Lunning M.A., Kopp N., Kim S., van Bodegom D., Bolla S., Schatz J.H., et al. // *Blood*. 2014. V. 123. № 9. P. 1293–1296.
55. Shenoy N., Bhagat T., Nieves E., Stenson M., Lawson J., Choudhary G.S., Habermann T., Nowakowski G., Singh R., Wu X., et al. // *Blood Cancer J.* 2017. V. 7. № 7. P. e587.
56. Zhao Z., Chen L., Dawlaty M.M., Pan F., Weeks O., Zhou Y., Cao Z., Shi H., Wang J., Lin L., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 8. P. 1692–1704.
57. Tommasini-Ghelfi S., Murnan K., Kouri F.M., Mahajan A.S., May J.L., Stegh A.H. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 5. P. eaaw4543.
58. Agathocleous M., Meacham C.E., Burgess R.J., Piskounova E., Zhao Z., Crane G.M., Cowin B.L., Bruner E., Murphy M.M., Chen W., et al. // *Nature*. 2017. V. 549. № 7673. P. 476–481.
59. Mingay M., Chaturvedi A., Bilenky M., Cao Q., Jackson L., Hui T., Moksa M., Heravi-Moussavi A., Humphries R.K., Heuser M., et al. // *Leukemia*. 2018. V. 32. № 1. P. 11–20.
60. Agus D.B., Gambhir S.S., Pardridge W.M., Spielholz C., Baselga J., Vera J.C., Golde D.W. // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. № 11. P. 2842–2848.
61. Caprile T., Salazar K., Astuya A., Cisternas P., Silva-Alvarez C., Montecinos H., Millan C., de Los Angeles Garcia M., Nualart F. // *J. Neurochem.* 2009. V. 108. № 3. P. 563–577.
62. Baillie N., Carr A.C., Peng S. // *Antioxidants (Basel)*. 2018. V. 7. № 9. P. 115.
63. Schoenfeld J.D., Sibenaller Z.A., Mapuskar K.A., Wagner B.A., Cramer-Morales K.L., Furqan M., Sandhu S., Carlisle T.L., Smith M.C., Abu Hejleh T., et al. // *Cancer Cell*. 2017. V. 31. № 4. P. 487–500.
64. Castro-Vega L.J., Buffet A., De Cubas A.A., Cascon A., Menara M., Khalifa E., Amar L., Azriel S., Bourdeau I., Chabre O., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 9. P. 2440–2446.

65. Oermann E.K., Wu J., Guan K.L., Xiong Y. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012. V. 23. № 4. P. 370–380.
66. Xiao M., Yang H., Xu W., Ma S., Lin H., Zhu H., Liu L., Liu Y., Yang C., Xu Y., et al. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 12. P. 1326–1338.
67. Lawenda B.D., Kelly K.M., Ladas E.J., Sagar S.M., Vickers A., Blumberg J.B. // *J. Natl Cancer Inst.* 2008. V. 100. № 11. P. 773–783.
68. Espey M.G., Chen P., Chalmers B., Drisko J., Sun A.Y., Levine M., Chen Q. // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 50. № 11. P. 1610–1619.
69. Ma Y., Chapman J., Levine M., Polireddy K., Drisko J., Chen Q. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 222. P. 222ra218.
70. Xia J., Xu H., Zhang X., Allamargot C., Coleman K.L., Nessler R., Frech I., Tricot G., Zhan F. // *EBioMedicine.* 2017. V. 18. P. 41–49.
71. Carr A.C., Cook J. // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. P. 1182.
72. Chen M.F., Yang C.M., Su C.M., Hu M.L. // *Nutr. Cancer.* 2014. V. 66. № 7. P. 1085–1091.
73. Polireddy K., Dong R., Reed G., Yu J., Chen P., Williamson S., Violet P.C., Pessetto Z., Godwin A.K., Fan F., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 17188.
74. Zhao H., Zhu H., Huang J., Zhu Y., Hong M., Zhu H., Zhang J., Li S., Yang L., Lian Y., et al. // *Leuk. Res.* 2018. V. 66. P. 1–7.
75. Mustafi S., Camarena V., Volmar C.H., Huff T.C., Sant D.W., Brothers S.P., Liu Z.J., Wahlestedt C., Wang G. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 2. P. 572–583.
76. Liu M., Ohtani H., Zhou W., Orskov A.D., Charlet J., Zhang Y.W., Shen H., Baylin S.B., Liang G., Gronbaek K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 37. P. 10238–10244.
77. Hackanson B., Robbel C., Wijermans P., Lubbert M. // *Ann. Hematol.* 2005. V. 84. № Suppl 1. P. 32–38.
78. Mayland C.R., Bennett M.I., Allan K. // *Palliat. Med.* 2005. V. 19. № 1. P. 17–20.
79. Huijskens M.J., Wodzig W.K., Walczak M., Germeraad W.T., Bos G.M. // *Results Immunol.* 2016. V. 6. P. 8–10.
80. Marcus S.L., Petrylak D.P., Dutcher J.P., Paietta E., Ciobanu N., Strauman J., Wiernik P.H., Hutner S.H., Frank O., Baker H. // *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. V. 54. № 6. P. 1292S–1297S.
81. Weijl N.I., Hopman G.D., Wipkink-Bakker A., Lentjes E.G., Berger H.M., Cleton F.J., Osanto S. // *Ann. Oncol.* 1998. V. 9. № 12. P. 1331–1337.
82. Inoue A., Zhang Y. // *Science.* 2011. V. 334. № 6053. P. 194.
83. Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. // *Nature.* 2000. V. 403. № 6769. P. 501–502.
84. Peat J.R., Dean W., Clark S.J., Krueger F., Smallwood S.A., Ficz G., Kim J.K., Marion J.C., Hore T.A., Reik W. // *Cell Rep.* 2014. V. 9. № 6. P. 1990–2000.
85. Wang L., Zhang J., Duan J., Gao X., Zhu W., Lu X., Yang L., Zhang J., Li G., Ci W., et al. // *Cell.* 2014. V. 157. № 4. P. 979–991.
86. Borgel J., Guibert S., Li Y., Chiba H., Schubeler D., Sasaki H., Forne T., Weber M. // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 12. P. 1093–1100.
87. Hackett J.A., Sengupta R., Zyllicz J.J., Murakami K., Lee C., Down T.A., Surani M.A. // *Science.* 2013. V. 339. № 6118. P. 448–452.
88. Hajkova P., Jeffries S.J., Lee C., Miller N., Jackson S.P., Surani M.A. // *Science.* 2010. V. 329. № 5987. P. 78–82.
89. Casanueva E., Ripoll C., Tolentino M., Morales R.M., Pfeffer F., Vilchis P., Vadillo-Ortega F. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. V. 81. № 4. P. 859–863.
90. Kamikawa Y.F., Donohoe M.E. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 5. P. e0125626.
91. Li Q., Wang H.Y., Chepelev I., Zhu Q., Wei G., Zhao K., Wang R.F. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 7. P. e1004524.
92. Welstead G.G., Creighton M.P., Bilodeau S., Cheng A.W., Markoulaki S., Young R.A., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 32. P. 13004–13009.
93. Dominguez-Salas P., Moore S.E., Baker M.S., Bergen A.W., Cox S.E., Dyer R.A., Fulford A.J., Guan Y., Laritsky E., Silver M.J., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3746.
94. Lambrot R., Xu C., Saint-Phar S., Chountalos G., Cohen T., Paquet M., Suderman M., Hallett M., Kimmins S. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2889.
95. DiTroia S.P., Percharde M., Guerquin M.J., Wall E., Collignon E., Ebata K.T., Mesh K., Mahesula S., Agathocleous M., Laird D.J., et al. // *Nature.* 2019. V. 573. № 7773. P. 271–275.
96. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell.* 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
97. Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.L., Ma Q.W., Wang L., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7260. P. 86–90.
98. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell.* 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
99. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al. // *Science.* 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
100. Eminli S., Foudi A., Stadtfeld M., Maherali N., Ahfeldt T., Mostoslavsky G., Hock H., Hochedlinger K. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 9. P. 968–976.
101. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Canamero M., Blasco M.A., Serrano M. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7259. P. 1136–1139.
102. Marion R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7259. P. 1149–1153.
103. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. // *Nature.* 2008. V. 454. № 7200. P. 49–55.
104. Banito A., Rashid S.T., Acosta J.C., Li S., Pereira C.F., Geti I., Pinho S., Silva J.C., Azuara V., Walsh M., et al. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 18. P. 2134–2139.
105. Cloos P.A., Christensen J., Agger K., Helin K. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 9. P. 1115–1140.
106. Mansour A.A., Gafni O., Weinberger L., Zviran A., Ayyash M., Rais Y., Krupalnik V., Zerbib M., Amann-Zalcenstein D., Maza I., et al. // *Nature.* 2012. V. 488. № 7411. P. 409–413.
107. Tzatsos A., Pfau R., Kampranis S.C., Tsiachlis P.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 8. P. 2641–2646.
108. Houbaviy H.B., Murray M.F., Sharp P.A. // *Dev. Cell.* 2003. V. 5. № 2. P. 351–358.
109. Suh M.R., Lee Y., Kim J.Y., Kim S.K., Moon S.H., Lee J.Y., Cha K.Y., Chung H.M., Yoon H.S., Moon S.Y., et al. // *Dev. Biol.* 2004. V. 270. № 2. P. 488–498.
110. Anokye-Danso F., Trivedi C.M., Juhr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., Yang W., Gruber P.J., Epstein J.A., et al. // *Cell Stem Cell.* 2011. V. 8. № 4. P. 376–388.
111. Costa Y., Ding J., Theunissen T.W., Faiola F., Hore T.A., Shliha P.V., Fidalgo M., Saunders A., Lawrence M., Dietmann S., et al. // *Nature.* 2013. V. 495. № 7441. P. 370–374.
112. Hu X., Zhang L., Mao S.Q., Li Z., Chen J., Zhang R.R., Wu H.P., Gao J., Guo F., Liu W., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 14. № 4. P. 512–522.
113. Hore T.A., von Meyenn F., Ravichandran M., Bachman M., Ficz G., Oxley D., Santos F., Balasubramanian S., Jurkowski T.P., Reik W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 43. P. 12202–12207.
114. Schwarz B.A., Bar-Nur O., Silva J.C., Hochedlinger K. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 3. P. 347–350.
115. Lee Chong T., Ahearn E.L., Cimmino L. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 128.

УДК 577.21

# Функции и механизмы действия инсуляторов в геномах высших эукариот

Л. С. Мельникова\*, П. Г. Георгиев, А. К. Головин  
Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия  
\*E-mail: lsm73@mail.ru

Поступила в редакцию 07.08.2020

Принята к печати 12.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11144

**РЕФЕРАТ** Механизмы дистанционных взаимодействий между участками хроматина и принципы формирования хромосомной архитектуры в настоящее время активно исследуются. В регуляции специфических дистанционных взаимодействий между энхансерами и промоторами участвует особый класс регуляторных элементов, названных инсуляторами. В обзоре описаны инсуляторы дрозофилы и млекопитающих, кратко охарактеризованы белки, обеспечивающие их функциональную активность. Изначально считалось, что основными свойствами инсуляторов являются блокирование энхансеров и образование независимых доменов транскрипции. Мы приводим экспериментальные факты, доказывающие, что хроматиновые петли, формируемые инсуляторами, играют лишь вспомогательную роль в блокировании энхансеров. Обсуждаются механизмы формирования топологически ассоциированных доменов, их роль в создании хромосомной архитектуры и в регуляции транскрипции генов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** инсуляторные белки, энхансер-промоторные взаимодействия, хроматиновые петли, регуляция транскрипции, Su(Hw), ТАД.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** PRE – polycomb response element; LCR – locus control region; ANT-C – *Antennapedia* complex; ТФ – транскрипционный фактор; ZF (zinc finger) – домен цинковый палец; BX-C – *Bithorax* complex; ЦНС – центральная нервная система; BTB – bric-a-brac, tramtrack and broad complex; POZ – poxvirus and zinc finger; ZAD – zinc finger-associated domain (домен, ассоциированный с цинковыми пальцами); ICR – imprinting control region; PRC2 – polycomb repressive complex 2; ТАД – топологически ассоциированный домен.

## ВВЕДЕНИЕ

В клетках высших эукариот один из основных этапов генной экспрессии – транскрипция, осуществляется в результате взаимодействия между промоторами, определяющими начало транскрипции и ее базовый уровень, и различными *цис*-регуляторными элементами, которые либо усиливают (энхансеры), либо ослабляют (сайленсеры) транскрипцию [1–3]. Энхансеры и сайленсеры могут находиться на значительном расстоянии от генов, транскрипцию которых регулируют, и отделяться от них многочисленными «чужими» генами с собственными регуляторными системами [4, 5]. Для объяснения механизма специфических энхансер/сайленсер-промоторных взаимодействий предлагалась модель, постулирующая разделение хромосом на транскрипционные (хроматиновые) домены, жестко ограничивающие контакты между регуляторными последовательностями генома [6].

В исследованиях на плодовой мушке *Drosophila melanogaster* впервые был найден новый класс регуляторных элементов, названных инсуляторами [7–9]. Изначально были описаны два свойства инсуляторов. Во-первых, инсуляторы препятствуют взаимодействию энхансера с промотором, если находятся между ними (энхансерблокирующая активность). Во-вторых, окружающие трансген инсуляторы нейтрализуют негативное или позитивное влияние соседствующего хроматина на его экспрессию (барьерная активность). В настоящее время инсуляторы обнаружены в геномах всех хорошо исследованных высших эукариот [10, 11]. Исходно предполагалось, что именно взаимодействующие между собой инсуляторы отвечают за формирование изолированных транскрипционных доменов. Однако дальнейшие исследования показали, что инсуляторы – это многофункциональные элементы, включенные в регуляторные системы многих генов [12–18].

### ИНСУЛЯТОРЫ В ГЕНОМАХ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

В первых работах по изучению инсуляторов в качестве модельного организма часто использовали дрозофилу. В то время на основе *P*-транспозона уже была разработана система, позволяющая эффективно модифицировать геном дрозофилы с помощью трансгенов [19]. Методы *in vivo* модификации генома позвоночных животных были созданы значительно позже [20, 21]. *P*-зависимая интеграция носит случайный характер, что позволяет изучать влияние различного хромосомного окружения на экспрессию трансгена. В качестве репортерного гена часто использовали ген *white*, отвечающий у дрозофилы за пигментацию глаз [22]. В разных трансгенных линиях, несущих ген *white* без энхансеров (*mini-white*), цвет глаз у мух варьировал от бледно-жёлтого до красного, что обуславливалось сайтами встраивания трансгенов. Это явление получило название эффекта хромосомного положения [22, 23]. Предполагалось, что зависимость экспрессии гена *mini-white* от хромосомного положения обусловлена активностью геномных энхансеров, расположенных рядом с местом интеграции трансгена. Однако позже доказали, что в более чем 70% случаев за активирующий эффект хромосомного окружения ответственна проходящая через *mini-white* транскрипция, инициированная в окружающих геномных районах [24].

Первыми инсуляторами, описанными в геноме дрозофилы, были последовательности *scs* и *scs'* (*specialized chromatin structure*), картированные в цитогенетическом локусе 87A7 как гиперчувствительные к нуклеазам участки ДНК, окружающие кластер из пяти генов, в том числе двух генов белков теплового шока 70 (*hsp70*) [8, 9, 25]. При активации генов *hsp70* хромомер 87A7 деконденсируется, образуя пучок на политенных хромосомах слюнных желез. Цитологические исследования показали, что элементы *scs* и *scs'* локализованы в местах, где деконденсированный локус 87A7 фланкируется конденсированным хроматином. Однако позже установили, что *scs* и *scs'* находятся внутри, а не на границах пучка и не ограничивают деконденсацию 87A7 [26]. Было высказано предположение, что *scs* и *scs'* являются границами транскрипционного домена, включающего гены *hsp70*. В составе трансгенов элементы *scs* и *scs'* проявляли энхансерблокирующие и барьерные свойства инсуляторов [8, 9]. Затем было показано, что инсуляторы *scs* (993 п.н.) и *scs'* (500 п.н.) имеют сложную структуру, которая включает промоторы генов и сигналы терминации транскрипции [27–30].

Наиболее изученный инсулятор дрозофилы обнаружен в регуляторной области ретротранспозона *gypsy* (МДГ4) [31]. Ретротранспозон *gypsy* влияет на экспрессию соседних генов, вызывая мутантные

фенотипы. При этом влияние *gypsy* на транскрипцию обусловлено последовательностью из 460 п.н., расположенной в его 5'-транскрибируемой нетранслируемой области [7, 32]. В трансгенных линиях инсулятор *gypsy* блокирует активность разнообразных энхансеров на всех стадиях развития дрозофилы [33–36]. Установлено, что инсулятор состоит из 12 вырожденных октамерных сайтов связывания белка Su(Hw) [32, 37, 38]. Изначально свойства инсулятора *gypsy* тестировали на регуляторной системе локуса *yellow*, отвечающего за пигментацию кутикулярных структур у эмбрионов, личинок и имаго [39]. Энхансеры, контролирующие транскрипцию *yellow* в пластинах крыла и кутикуле тела, расположены в 5'-области гена, тогда как энхансеры, контролирующие экспрессию в щетинках, находятся в интроне [7]. В аллеле  $y^2$  ретротранспозон *gypsy* встроен в 5'-область гена *yellow* между промотором и энхансерами, активирующими транскрипцию в крыльях и теле. В результате инсулятор блокирует энхансеры тела и крыльев, но не влияет на активность энхансера щетинок, локализованного в интроне гена (рис. 1). На фоне мутации, инактивирующей ген *su(Hw)*, инсуляция в аллеле  $y^2$

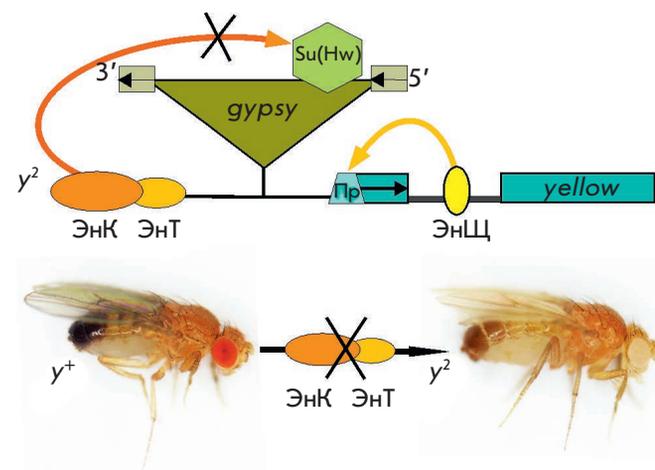


Рис. 1. Схематичное изображение аллеля  $y^2$ . Экзоны гена *yellow* обозначены прямоугольниками со стрелкой, указывающей направление транскрипции; ЭнК – энхансер крыльев; ЭнТ – энхансер тела; ЭнЩ – энхансер щетинок; Пр – промотор гена. Ретротранспозон *gypsy* изображен в виде треугольника, прямоугольники на его концах – длинные концевые повторы, их направление указано стрелками. Инсулятор Su(Hw) изображен как шестиугольник внутри *gypsy*. На фотографиях представлены фенотипы мух:  $y^+$  – дикий тип, ген *yellow* экспрессируется во всех кутикулярных структурах;  $y^2$  – энхансеры тела и крыльев блокированы инсулятором Su(Hw) (изображено как зачеркивание), ген *yellow* не экспрессируется в кутикуле тела и крыльях, но продолжает экспрессироваться в щетинках

исчезает, и экспрессия гена *yellow* полностью восстанавливается [40]. В нескольких исследованиях показано, что при интеграции трансгена в гетерохроматиновые области генома или в присутствии PRE (Polycomb Response Element)-зависимого сайленсера *gypsy* инсулятор эффективно защищает от репрессии репортерный ген *white* [41, 42].

Еще один инсулятор найден в длинном концевом повторе ретротранспозона *Idefix* [43]. С помощью трансгенных линий выявлена барьерная активность инсулятора *Idefix* и его способность блокировать различные энхансеры [44].

Первый функциональный геномный инсулятор 1A2, содержащий два сайта связывания белка Su(Hw), был найден в 3'-области гена *yellow* [45, 46]. Оказалось, что многие геномные последовательности ДНК, включающие 1–3 сайта связывания Su(Hw), в составе трансгенов проявляют свойства инсуляторов [47–49]. Однако при использовании синтезированных повторяющихся Su(Hw)-связывающих сайтов установлено, что эффективную инсуляцию обеспечивают минимум четыре сайта [50]. Это противоречие можно объяснить существованием пока не идентифицированных белков, которые совместно с Su(Hw) участвуют в формировании функциональных эндогенных инсуляторов [51].

В геноме дрозофилы обнаружено множество инсуляторных последовательностей, не содержащих сайты связывания белка Su(Hw). Среди них инсуляторы SF1 и SF2 из комплекса *Antennapedia* (ANT-C) [52, 53]; последовательности *facet-strawberry*, защищающие ген *Notch* от влияния окружающего хроматина [54]; инсулятор *Wari* [55], расположенный на 3'-конце гена *white*; граничный элемент ME, блокирующий действие энхансера из гена *eyeless* на промотор соседнего гена *myoglianin* [56]. В регуляторной области комплекса *Bithorax* (BX-C) локализованы границы независимых транскрипционных доменов, *Mcp*, *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8*, демонстрирующие в трансгенных линиях свойства инсуляторов [57–71].

Первые инсуляторы позвоночных были найдены на границах кластеров транскрипционно активных генов и гетерохроматиновых районов. На 5'-конце β-глобинового локуса курицы был обнаружен инсулятор HS4 [72]. Коровая последовательность HS4 содержит сайт связывания белка CTCF [73]. В дальнейшем поиск новых инсуляторов позвоночных часто основывался на тестировании фрагментов ДНК, содержащих CTCF-связывающие сайты [74, 75]. Так у мыши и человека был найден инсулятор, содержащий четыре сайта связывания CTCF, который играет ключевую роль в импринтированной экспрессии локуса *Igf2/H19* [76–78]. В настоящее время описано множество CTCF-зависимых инсуляторов

позвоночных, что согласуется с представлениями о ключевой роли белка CTCF в организации архитектуры хроматина [74, 75].

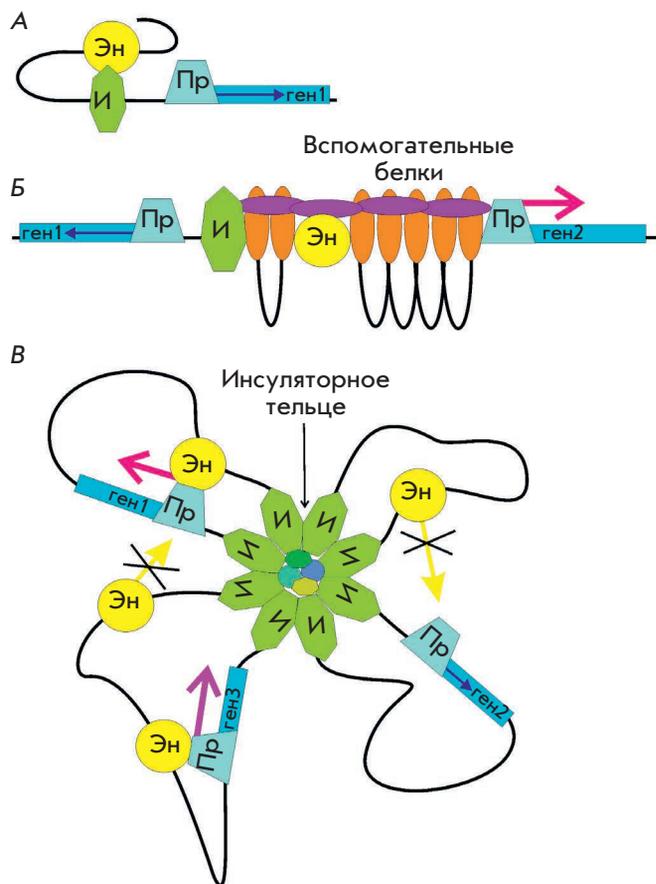
### МОДЕЛИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛЯТОРОВ

На основании данных о свойствах инсуляторов были предложены две группы альтернативных моделей, объясняющих механизм их функционирования.

Транскрипционные модели предполагали, что инсулятор активно прерывает специфичные дистанционные взаимодействия между энхансером и промотором [73, 79, 80]. В зависимости от возможного механизма энхансер-промоторных взаимодействий рассматривали различные варианты действия инсуляторов. Согласно одной из моделей, энхансер «ищет» промотор, двигаясь вдоль хроматиновой фибриллы. В этом случае инсулятор является физическим барьером, препятствующим продвижению энхансера. Также предполагалось, что инсуляторы представляют собой псевдопромоторы. Они не иницируют транскрипцию, но способны взаимодействовать с энхансерами и тем самым блокировать их активность (рис. 2А). Согласно другой популярной модели, дистанционные энхансер-промоторные контакты обеспечиваются специальными вспомогательными белками. Например, гомодимеризующийся белок LDB1 млекопитающих формирует специфичные контакты между энхансерами и промоторами многих генов [81]. Белок Chip дрозофилы облегчает энхансер-промоторное взаимодействие в локусе *cut* [82]. Показано, что белок Chip взаимодействует с компонентами инсулятора *gypsy* [83, 84]. Когда энхансер-промоторное взаимодействие ослаблено мутацией в белке Chip, Su(Hw)-зависимая инсуляция становится более эффективной. Таким образом, инсулятор может блокировать действие вспомогательных белков, обеспечивающих энхансер-промоторную коммуникацию (рис. 2Б).

Широкую популярность приобрели структурные модели действия инсуляторов [85]. Исходно они базировались на представлениях, что хромосомы формируют большие независимые хроматиновые петли [6]. Предполагалось, что хроматиновые петли являются независимыми доменами транскрипции и блокируют взаимодействия между регуляторными элементами из соседних доменов.

В дальнейшем большое значение приобрели работы по локализации белка Su(Hw) на хромосомах и в ядре. Считалось, что диски политенных хромосом соответствуют транскрипционным доменам, а междиски – их границам. Было показано, что сайты связывания Su(Hw) находятся в некоторых междисках, т.е. ограничивают транскрипционные домены [86]. В культурах клеток дрозофилы, эм-



**Рис. 2.** Модели механизма действия инсульторов. А – модель «ловушки энхансера». Б – блокирование вспомогательных белков. В – структурная модель. Формирование независимых транскрипционных доменов. Обозначения: Эн – энхансер; И – инсультор; Пр – промотор. Красными стрелками обозначена активация транскрипции специфичным энхансером, синими – базовая активность промотора. Зачеркнутые стрелки обозначают блокирование взаимодействий между энхансерами и промоторами из соседних доменов

брионах и имагинальных дисках белок Su(Hw) был локализован в составе компактных ядерных образований, названных инсульторными тельцами [86]. Предполагалось, что каждое инсульторное тельце состоит из множества отдельных взаимодействующих между собой инсульторов, которые делят хроматиновую фибриллу на доменные петли и образуют структуры, подобные розетке (рис. 2В). При этом находящиеся в основании розетки инсульторы могут взаимодействовать с ядерной ламиной (оболочкой) или с компонентами ядерной поры, что создает основу для пространственной организации хроматина. Структурные модели постулируют, что основная роль инсульторов заключается в формировании хроматиновых петель, а инсульторная активность рассматривается как следствие этой организации.

Образование хроматиновых петель может топологически или физически препятствовать взаимодействию между находящимися в соседних доменах энхансерами и промоторами [87].

В настоящее время структурные модели опираются на данные об организации хромосом высших эукариот в топологически ассоциированные домены (ТАД) [88–91]. Выдвинута гипотеза, что инсульторы являются границами ТАДов. Взаимодействие между инсульторами приводит к формированию хроматиновых петель, ограничивающих активность энхансеров.

**Su(Hw)-ЗАВИСИМЫЙ КОМПЛЕКС КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНСУЛЬТОРОВ**

Активность инсультора обеспечивается комплексом взаимодействующих белков, которые связываются с инсульторной последовательностью ДНК. Во многих работах механизмы функционирования и формирования инсульторов дрозофилы изучали на Su(Hw)-зависимом комплексе.

Ключевой белок комплекса, Su(Hw), экспрессируется в течение всего развития и присутствует в большинстве тканей дрозофилы. Инактивация гена *su(Hw)* приводит к стерильности самок [35, 92]. Белок Su(Hw) состоит из N-концевого участка, обогащенного кислыми аминокислотами, ДНК-связывающего домена, содержащего 12 цинковых пальцев (ZF) типа C2H2, и C-концевого района, также богатого кислыми аминокислотными остатками [92]. Su(Hw) связывается с консенсусной последовательностью (около 26 п.н.), состоящей из трех модулей [93]. Кластер ZF6–9 связывается с основным, центральным модулем; кластер ZF2–4 – с «нижним» CG-богатым модулем; кластер ZF10–12 – с «верхним» AT-богатым модулем (рис. 3). Десятый ZF влияет на эффективность связывания белка с частью сайтов [93, 94]. Например, мутация в ZF10 не позволяет белку Su(Hw) эффективно связываться с последовательностью инсультора *gypsy* [51]. В C-концевой части Su(Hw) находится домен (716–892 а.о.), который отвечает за инсультацию [32, 92, 95] и за способность белка Su(Hw) репрессировать транскрипцию генов центральной нервной системы (ЦНС) в яичниках [96–98]. Через прямое взаимодействие с Su(Hw) в состав комплекса привлекаются еще два белка Mod(mdg4)-67.2 и CP190 (рис. 3).

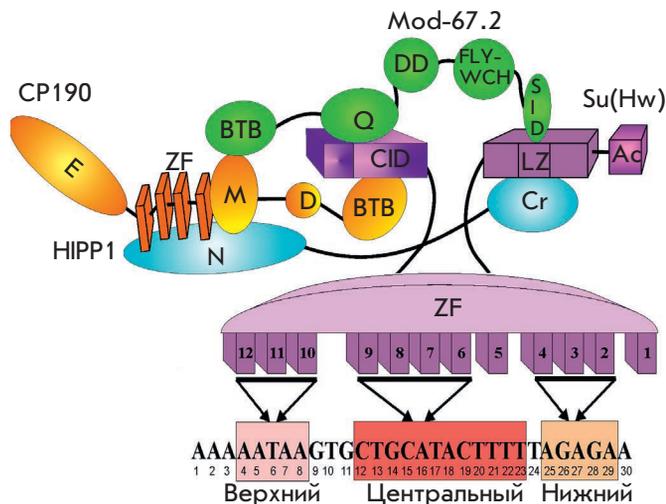
Белок Mod(mdg4)-67.2 продуцируется сложным локусом *mod(mdg4)* [99, 100]. На N-конце белка Mod(mdg4)-67.2 находится домен ВТВ/POZ (bric-a-brac, tramtrack and broad complex/poxvirus and zinc finger), который широко распространен у высших эукариот и обычно гомодимеризуется. Однако ВТВ-домен Mod(mdg4)-67.2 относится к осо-

бой специфичной для насекомых группе [101]. ВТВ-домены этой группы могут образовывать и гомо-, и гетеромультимерные комплексы [102]. На С-конце белка Mod(mdg4)-67.2 находится специфичный домен, взаимодействующий с С-концевым (716–892 а.о.) доменом Su(Hw) [83, 103]. Кроме того, N-концевая часть белка Su(Hw) взаимодействует с глутамин-богатым районом белка Mod(mdg4)-67.2 [104] (рис. 3). Mod(mdg4)-67.2 участвует в энхансерблокирующей активности инсулятора Su(Hw).

Белок CP190 одновременно взаимодействует с Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2, что стабилизирует формирование инсуляторного комплекса. На N-конце CP190 находится ВТВ-домен, формирующий стабильные гомодимеры [102, 105–107]. На С-конце CP190 располагаются глутамин- и аспарагин-богатые районы, а между ними – ответственный за взаимодействие с микротрубочками М-домен и четыре ZF [108]. ВТВ-домен CP190 взаимодействует с двумя неструктурированными N-концевыми районами белка Su(Hw), локализованными между 88 и 202 а.о. [109]. Одновременно домен М белка CP190 взаимодействует с ВТВ-доменом белка Mod(mdg4)-67.2 [104, 110] (рис. 3).

Делеции отдельных доменов в белках Su(Hw), Mod(mdg4)-67.2 и CP190 не влияют на сборку функционального комплекса *in vivo*. Таким образом, формирование Su(Hw) инсулятора обеспечивается многочисленными взаимодействиями между его белковыми компонентами, которые частично компенсируют и стабилизируют друг друга. В полногеномных исследованиях показано, что комплекс, включающий все три белка CP190/Mod(mdg4)-67.2/Su(Hw), собирается только на части Su(Hw)-связывающих сайтов [48, 94, 111]. Посадка инсуляторного комплекса на такие сайты в значительной мере опосредуется белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2 [104, 109].

Недавно был идентифицирован новый партнер Su(Hw) – белок HIPPI (HP1 and insulator partner protein 1) [112]. На концах белка HIPPI локализованы высокоструктурированные области (1–212 и 675–778 а.о. соответственно), причем С-концевая область соответствует домену кротоназы [113, 114]. Кротоназный домен HIPPI связывается с С-концевым районом Su(Hw) (637–892 а.о.), который одновременно отвечает за энхансерблокирующую и репрессорную активность инсулятора. N-Концевой домен HIPPI взаимодействует с доменом М и ZF белка CP190 [115] (рис. 3). Показано, что инактивация гена *Hipp1* не влияет на фертильность мух и зависимость от Su(Hw) инсуляцию [115, 116]. Однако одновременная инактивация генов *Hipp1* и *mod(mdg4)-67.2* значительно меняет активность инсулятора *gypsy* и сильно ослабляет связывание CP190 с Su(Hw)-



**Рис. 3.** Модель формирования Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса. Домены белка Su(Hw) обозначены сиреневым цветом; домены белка Mod(mdg4)-67.2 – зеленым; домены белка CP190 – оранжевым; домены белка HIPPI – голубым. Обозначения доменов: CID – взаимодействующий с CP190 домен; Ac – С-концевой кислый домен; ZF – домен цинковых пальцев; LZ – лейциновая молния; ВТВ – ВТВ/POZ-домен; Q – обогащенный глутамином район; DD – димеризующий домен; FLYWCH – цинковый палец типа FLYWCH; SID – взаимодействующий с Su(Hw) домен; D – обогащенный аспарагином район; М – взаимодействующий с центросомой домен; E – С-концевой домен, обогащенный глутамином. Внизу приведена консенсусная последовательность связывания белка Su(Hw) из инсулятора *gypsy*. ZF, связывающие каждый из мотивов, указаны стрелками

зависимыми сайтами [115]. Таким образом, рекрутирование HIPPI и CP190 в состав инсулятора Su(Hw) является взаимозависимым.

Также установлено, что с ZF10–12 белка Su(Hw) напрямую взаимодействует белок ENY2 [117]. На трансгенных линиях продемонстрировано, что белок ENY2 участвует в барьерной активности инсулятора Su(Hw) и защищает экспрессию репортерного гена от PRE-зависимой репрессии. Интересно, что ENY2 связывается также с ZF белка dCTCF (ортолог CTCF у дрозофилы) и участвует в барьерной функции dCTCF-зависимых инсуляторов [118]. Вероятно, рекрутирование неизвестного ENY2-зависимого комплекса на ZF различных транскрипционных факторов (ТФ) можно рассматривать как общий механизм защиты генов от PRE-зависимой репрессии.

В работе Su(Hw)-зависимого комплекса могут принимать участие РНК-связывающие белки Sherp и Rump, которые функционируют как негативные

регуляторы энхансерблокирующей активности [119, 120]. Кроме того, активность инсультатора Su(Hw) может регулироваться компонентами системы РНК-интерференции – Ago, aub, piwi и Rm62 [121]. Однако механизм работы этих белков не был раскрыт.

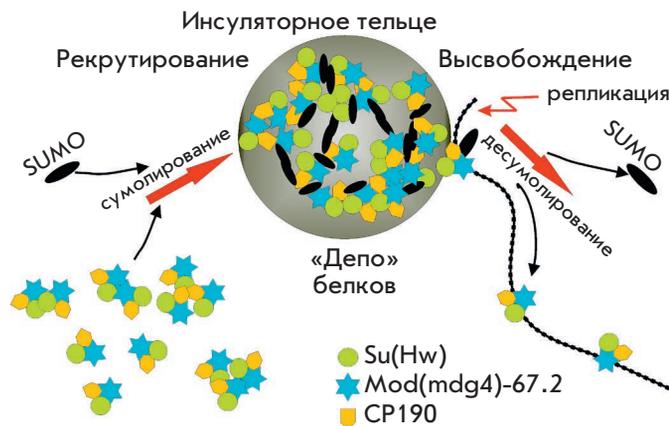
В ядре белки Su(Hw), CP190 и Mod(mdg4)-67.2 локализируются в инсультаторных тельцах [122, 123]. Для включения белков Su(Hw)-зависимого комплекса в инсультаторные тельца необходима посттрансляционная модификация белков CP190 и Mod(mdg4)-67.2 убиквитин-подобным модификатором (SUMO) [122–124]. В составе инсультаторных телец также обнаружен белок dCTCF [125]. В модельных системах *in vivo* было показано, что образование инсультаторных телец никак не связано с инсультацией [122], а сумолирование не является необходимым условием проявления энхансерблокирующей активности [123]. Можно предположить, что инсультаторные тельца служат своеобразными «депо» хроматиновых белков. В них происходит предварительная сборка белковых комплексов, которые эффективно связываются с синтезируемой в процессе репликации ДНК (рис. 4).

Формирование инсультаторных телец регулируется количеством матриксного белка EAST [124]. В физиологических условиях белок EAST не связывается с хроматином [126], но взаимодействует с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2 [124]. Уровень экспрессии EAST влияет на связывание Su(Hw)-зависимого комплекса с хроматином и на активность Su(Hw)-зависимых инсультаторов [124, 127]. Такие эффекты EAST можно объяснить, основываясь на вышеописанной модели, согласно которой предварительная сборка инсультаторных комплексов происходит в инсультаторных тельцах.

### КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛЬТАТОРНЫХ БЕЛКОВ

Большинство инсультаторных комплексов формируется вокруг одного или нескольких ключевых ДНК-связывающих белков. Необходимо отметить, что не существует четких параметров, в соответствии с которыми белок можно отнести к классу инсультаторных. Поэтому любой белок, обнаруженный в составе одного или нескольких инсультаторов, автоматически зачисляется в группу инсультаторных белков. У *D. melanogaster* описано 11 белков с энхансерблокирующими свойствами, содержащих ДНК-связывающие домены. Многие из них, dCTCF, Su(Hw), Pita, ZIPIC, GAF, содержат ZF типа C2H2 [128–130]. У позвоночных пока описан единственный консервативный инсультаторный белок CTCF [131].

Белок CTCF экспрессируется в большинстве тканей млекопитающих [132]. Он необходим на ранних



**Рис. 4.** Модель формирования и функционирования инсультаторных телец. Белки CP190/Su(Hw)/Mod(mdg4)-67.2 рекрутируются в инсультаторные тельца за счет сумолирования. В инсультаторных тельцах осуществляется предварительная сборка Su(Hw)-зависимых комплексов и их ассоциация с другими ТФ. «Созревший» инсультаторный комплекс транзитивно взаимодействует с хроматиновой фибриллой, покидает инсультаторные тельца за счет десумолирования и связывается с сайтами на хроматине

стадиях развития мышей, участвует в клеточном цикле, апоптозе и дифференцировке клеток [133–135]. У дрозофилы обнаружен ортолог CTCF с аналогичной доменной структурой (dCTCF) [136]. Белок dCTCF связывается с большинством границ в ВХ-С и определяет их инсультаторную активность. В центральной части CTCF у позвоночных и дрозофилы находится кластер, содержащий 11 ZF. Изучение комплекса CTCF–ДНК человека показало, что ZF3–7 связываются с консенсусным мотивом из 15 п.н. [137]. С помощью мутаций отдельных ZF было продемонстрировано, что в первичных лимфоцитах мышей ZF9–11 и ZF1–2 связываются с фланкирующими консенсусный мотив последовательностями и стабилизируют специфичное связывание CTCF [138]. На N-конце CTCF разных организмов локализован неструктурированный домен, формирующий гомодимеры [139]. В N-концевой части CTCF человека также найден мотив, взаимодействующий с когезиновым комплексом [140]. Взаимодействуя с когезиновым комплексом, CTCF формирует хроматиновые петли и большую часть границ ТАДов, а также опосредует локальные взаимодействия между регуляторными элементами [90, 132, 141].

Белки ZIPIC, Pita и Zw5 содержат на N-конце домен ZAD (zinc finger-associated domain), а на C-конце кластеры ZF [27, 68, 142, 143]. Эти белки интенсивно экспрессируются на всех стадиях развития дрозофилы, особенно на эмбриональной. Мутации, инак-

тивирующие гены *pita* и *zw5*, вызывают раннюю эмбриональную летальность, что свидетельствует о важной роли белков Pita и Zw5 в регуляции генной экспрессии [27, 144]. Впервые белок Zw5 обнаружили на промоторе гена *CG31211*, входящего в состав инсулятора *scs* [27]. Анализ полногеномного распределения белков ZIPIC, Pita и Zw5 показал, что они связываются преимущественно с промоторами генов вблизи сайтов инициации транскрипции и, подобно белку CTCF, часто колокализуются с компонентами когезинового и конденсинового комплексов [48, 145]. Благодаря ZAD-доменам белки ZIPIC, Pita и Zw5 способны формировать гомодимеры [145]. В трансгенных линиях мультиплицированные сайты связывания этих белков формируют инсуляторы, блокирующие активность энхансеров и PRE-зависимую репрессию [146].

Белок GAF участвует в функционировании инсуляторов Fab-7 из BX-C [70], SF1 из ANT-C [52], а также инсулятора, расположенного между генами *myoglianin* и *eyeless* [56]. В центральной части белка находится один ZF, связывающийся с мотивом GAGAG [147, 148]. Как и у белка Mod(mdg4)-67.2, на N-конце GAF расположен специфичный для насекомых ВТВ-домен, формирующий гомо- и гетеромультимеры [101, 102]. ВТВ-домены GAF и Mod(mdg4)-67.2 могут взаимодействовать с белками из разных транскрипционных комплексов [102, 149–151].

Изначально белок BEAF-32 идентифицирован как фактор, взаимодействующий с инсулятором *scs*' [30, 152]. Для связывания с ДНК BEAF-32 использует расположенный на N-конце С2Н2-подобный домен, называемый BED. На С-конце белка находится домен BESS, необходимый для тримеризации BEAF [152, 153]. Каждая субъединица комплекса BEAF связывает один мотив CGATA, в то время как тримеры BEAF с высокой аффинностью связываются с кластерами мотивов CGATA [152]. Результаты полногеномного анализа показывают, что BEAF преимущественно ассоциирован с промоторными областями активных генов и участвует в стимуляции транскрипции [154, 155].

Белки Ibf1 и Ibf2 (Insulator binding factors 1 и 2), как и BEAF-32, связываются с ДНК через домен BED и образуют гетероолигомеры [156]. Полногеномный анализ показал, что Ibf1/Ibf2 часто колокализуются с другими инсуляторными белками, прежде всего с CP190 и dCTCF.

Компоненты нового, недавно описанного инсуляторного комплекса Elba (Early boundary activity) – Elba1 и Elba2, используют для связывания с ДНК С-концевые консервативные домены VEN [57]. Третий белок, Elba3, отвечает за образование димера Elba1/Elba2, который взаимодействует со специфич-

ными инсуляторными сайтами. Белок Elba2 экспрессируется на большинстве стадий развития, но два других компонента комплекса присутствуют только на ранней эмбриональной стадии. Elba распознает асимметричную последовательность ССААТААГ (8 п.н.), входящую в состав инсулятора Fab-7 из BX-C. С инсулятором Fab-7 связывается еще один белок, Insv (Insensitive) [157, 158]. Этот белок, как и белки Elba, содержит С-концевой домен VEN и экспрессируется преимущественно в ранних эмбрионах [158]. Комплекс Elba и белок Insv необходимы для функционирования инсулятора Fab-7 *in vivo* [57, 157].

Все перечисленные инсуляторные белки дрозофилы (за исключением Zw5 и комплекса Elba) взаимодействуют с белком CP190 [68, 105, 108, 125, 156, 158–162]. ДНК-связывающие инсуляторные белки рекрутируют CP190 на хроматин [68, 105, 108, 161]. В то же время белок CP190 связывается со значительной частью промоторов генов домашнего хозяйства [108, 159, 161] и участвует в создании открытого хроматина [163]. Присутствие белка CP190 на инсуляторах и промоторах говорит о возможности функциональной связи между ними.

#### ПРЯМОЕ УЧАСТИЕ ИНСУЛЯТОРОВ В ЭНХАНСЕР-ПРОМОТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Большая часть сайтов связывания инсуляторных белков обнаружена в промоторных областях разных генов [47, 48]. Известно, что одной из основных функций белка CTCF млекопитающих является создание активных промоторов [164]. Участие одних и тех же белков в формировании промоторных и инсуляторных комплексов согласуется с транскрипционными моделями действия инсуляторов.

В трансгенных линиях дрозофилы инсулятор *gypsy* полностью блокирует энхансеры гена *yellow*, которые изолированы им от промотора, но никак не влияет на базовую активность промотора [7]. Однако если промотор гена *yellow* ослаблен мутацией, то инсуляторы *gypsy* и 1A2 восстанавливают его активность независимо от своего положения в трансгене [165]. Как и активные промоторы, Su(Hw)-зависимые инсуляторы рекрутируют комплексы SAGA и Brahma, формирующие на регуляторных элементах области открытого хроматина [166]. Вероятно, инсуляторы Su(Hw) компенсируют частичную инактивацию промотора *yellow*, рекрутируя на него ремодулирующие комплексы. Следовательно, связанные с инсулятором комплексы должны находиться в непосредственной близости от промотора. Действительно, показано, что в трансгенных линиях инсуляторы способствуют дистанционным взаимодействиям между промоторами и расположенными на 3'-конце репортерных генов активаторами GAL4 [165, 167]. С помощью ChIP

и 3С-анализов продемонстрировано взаимодействие между энхансером, находящимся перед промотором гена *white*, и инсулятором *gypsy*, расположенным на 3'-конце гена [168]. Вероятно, локальные взаимодействия между регуляторными элементами обеспечиваются белками, которые одновременно связываются с инсуляторами и промоторами [47, 48, 160, 169]. Показано, что белки CP190, Chromator и BEAF-32 могут обеспечивать дистанционные взаимодействия между участками хроматина [107]. Можно предположить, что основная функция эндогенных инсуляторов, найденных с 3'-стороны генов *yellow* и *white* [45, 46, 55], – повышение активности промоторов этих генов.

Все остальные инсуляторы гораздо слабее блокируют энхансеры гена *yellow*, чем инсулятор *gypsy* [55, 64, 68, 170]. С другой стороны, инсулятор *gypsy*, встроенный в трансгенах между энхансером и промотором гена *white*, только незначительно ослабляет экспрессию *white* в глазах мух [168]. Интересно, что С-концевой домен белка Su(Hw) отвечает одновременно за блокирование энхансеров гена *yellow* и за репрессию промоторов генов ЦНС в гонадах самок [171]. При этом сайты связывания Su(Hw) находятся непосредственно в промоторах генов ЦНС [98]. Скорее всего, репрессия обусловлена рекрутированием специфичного для герминальной ткани репрессорного комплекса, так как в глазах репрессия не наблюдается [28].

В отсутствие белка Mod(mdg4)-67.2 инсулятор *gypsy* превращается в репрессор промотора гена *yellow* [83, 95, 110]. Стоит отметить, что белок Mod(mdg4)-67.2 рекрутируется в инсуляторный комплекс через С-концевой домен Su(Hw), отвечающий за инсуляцию/репрессию. Репрессию в локусе *yellow* можно объяснить увеличением эффективности связывания репрессорного комплекса с С-концевым доменом Su(Hw) в отсутствие белка Mod(mdg4)-67.2. Показано, что *gypsy*-зависимая репрессия осуществляется через ту же предпромоторную последовательность гена *yellow*, которая необходима для дистанционных энхансер-промоторных взаимодействий [172]. Возможно, репрессорный Su(Hw)-зависимый комплекс взаимодействует с ТФ промотора, обеспечивающими коммуникацию с энхансерами.

Приведенные нами экспериментальные данные подтверждают модель, согласно которой инсуляторы динамично взаимодействуют с энхансерами и промоторами. Когда инсулятор встраивается между энхансером и промотором, взаимодействие инсуляторного комплекса с ТФ промотора или энхансера препятствует эффективному взаимодействию между ними. Например, показано, что белок Mod(mdg4)-67.2 взаимодействует с белком Zeste. Белок Zeste связывается с энхансером и промотором гена *white* и обе-

спечивает коммуникацию между ними [173, 174]. Взаимодействие между Mod(mdg4)-67 и Zeste может мешать формированию правильных энхансер-промоторных контактов и приводить к снижению транскрипции. Если же инсулятор привлекает в область промотора репрессорные комплексы, то активность энхансеров блокируется полностью.

Белок СТСФ позвоночных часто формирует хроматиновые петли, взаимодействуя с активными промоторами [175, 176]. СТСФ непосредственно взаимодействует с TAF3 и TFII-I, компонентами промоторного комплекса TFIID [177, 178]. Следовательно, СТСФ-промоторные взаимодействия могут препятствовать формированию энхансер-промоторных контактов. В локусе *Igf2/H19* млекопитающих гены расположены так, что ген *H19* в материнском аллеле и ген *Igf2* в отцовском аллеле активируются общими дистальными энхансерами [75]. В материнском аллеле активируется ген *H19*, а в отцовском – ген *Igf2*. Взаимодействие между общими энхансерами и промоторами генов регулируется локализованным в ICR (imprinting control region) СТСФ-зависимым инсулятором. С помощью метода 3С показано, что в материнском аллеле белок СТСФ обеспечивает прямое взаимодействие между инсулятором и промотором *Igf2*, которое блокирует активацию *Igf2* дистальными энхансерами [179–181]. Интересно, что белок СТСФ привлекает на промотор *Igf2* репрессирующий комплекс PRC2 (Polycomb repressive complex 2) [181].

### РОЛЬ ХРОМАТИНОВЫХ ПЕТЕЛЬ В БЛОКИРОВАНИИ ЭНХАНСЕРОВ

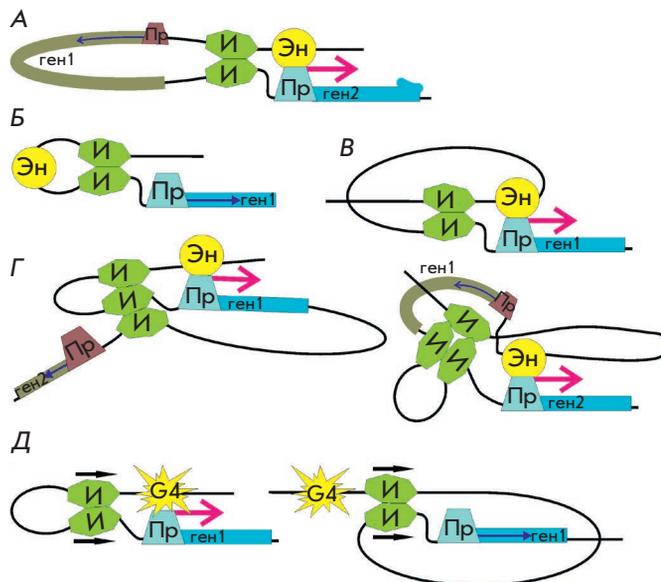
Структурные модели действия инсуляторов постулируют, что хроматиновые петли и ТАДы блокируют взаимодействия между регуляторными элементами из соседних доменов [85, 182, 183]. Однако способность хроматиновых петель полностью блокировать энхансер-промоторные взаимодействия не подтверждена экспериментально.

Функциональную роль сформированных инсуляторами хроматиновых петель подробно изучали на трансгенных линиях дрозофил. Было обнаружено, что два идентичных инсулятора, встроенные между энхансером и промотором, нейтрализуют активность друг друга [55, 170, 184–186]. Для объяснения этого феномена было выдвинуто предположение, что одинаковые инсуляторы более эффективно взаимодействуют между собой, чем с энхансером или промотором. Поэтому они не препятствуют энхансер-промоторному взаимодействию и даже способствуют коммуникации между регуляторными элементами на больших дистанциях. Эта модель подтверждалась экспериментами, в которых между

энхансером и промотором репортерного гена располагался другой ген, окруженный инсуляторами [59, 186–188]. Эффективная энхансер-зависимая активация репортерного гена наблюдалась только в присутствии инсуляторов. Следовательно, образованная парой идентичных инсуляторов хроматиновая петля сближала энхансер и промотор (рис. 5А). Аналогичные результаты были получены на линиях, в которых энхансер замещали репрессирующим транскрипции PRE [189]. Ген, расположенный между двумя инсуляторами *gypsy*, был защищен от PRE-зависимой репрессии. В то же время взаимодействие между инсуляторами приближало PRE ко второму гену, что приводило к его репрессии. Физическое взаимодействие между инсуляторами и сближение PRE со вторым репортерным геном были подтверждены методом 3С [190].

Взаимная нейтрализация двух идентичных инсуляторов позволяет изучить непосредственную роль формируемой ими хроматиновой петли в блокировании энхансер-промоторных контактов. Как упоминалось выше, встраивание одной копии инсулятора *gypsy* между энхансером и промотором гена *white* лишь незначительно ослабляет активность энхансера [168]. Однако окружение энхансера парой инсуляторов *gypsy* полностью инактивирует его. Этот результат предполагает, что формирование небольшой хроматиновой петли, содержащей энхансер, топологически или стерически препятствует продуктивному взаимодействию между энхансером и промотором гена *white* (рис. 5В). В то же время в трансгенных линиях одна копия инсулятора *gypsy* полностью блокирует энхансеры, активирующие экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях [170, 191]. Оказалось, что интеграция второй копии инсулятора *gypsy* перед энхансерами на расстоянии около 8 т.п.н. от первого приводит к восстановлению экспрессии *yellow*. Таким образом, формирование хроматиновой петли размером 8 т.п.н. нейтрализует инсуляцию (рис. 5В). Когда расстояние между окружающими энхансерами *yellow* инсуляторами уменьшалось до 2 т.п.н., инсуляция полностью восстанавливалась. Следовательно, только небольшие петли хроматина, включающие энхансер, способны полностью блокировать его активность. В ситуациях *in vivo* размеры хроматиновых петель намного больше 2–3 т.п.н., что предполагает возможность взаимодействия между регуляторными элементами, расположенными в соседних или удаленных друг от друга петлях.

Тестирование линий с тремя копиями инсуляторов Su(Hw), встроенных в различных комбинациях между энхансерами и двумя репортерными генами, показало, что все три копии взаимодействовали между собой [170, 191]. При этом формирование хромати-



**Рис. 5.** Моделирование хроматиновых петель в трансгенных линиях дрозофил. А – образованная идентичными инсуляторами петля приближает энхансер к промотору. Б – тесная петля между двумя инсуляторами блокирует заключенный в ней энхансер. В – увеличение дистанции между инсуляторами, окружающими энхансер, нейтрализует инсуляцию. Г – формируемые тремя инсуляторами петли не препятствуют активации транскрипции репортерного гена. Д – взаимная ориентация инсуляторов (указана стрелками) определяет конфигурацию хроматиновой петли и, как следствие, возможность активации транскрипции. Обозначения: G4 – дрожжевой активатор GAL4; остальные обозначения, как на рис. 2

новой петли вокруг энхансера или репортерного гена не приводило к инсуляции. Этот результат еще раз подтверждает, что хроматиновые петли не играют ключевой роли в блокировании энхансер-промоторных взаимодействий (рис. 5Г).

В трансгенных линиях пары некоторых инсуляторов, например *gypsy*, *Msc* и *Fab-7*, способны взаимодействовать на сверхдальних расстояниях, достигающих сотен тысяч пар нуклеотидов [192, 193]. На границах локуса *eve*, экспрессирующего ТФ *pair-rule*, вовлеченный в эмбриональное развитие, обнаружены инсуляторы *Homie* и *Nhomie* [194]. Эти инсуляторы эффективно взаимодействуют между собой в трансгенных линиях и могут поддерживать сверхдальние взаимодействия между энхансерами и промотором локуса *eve* в геноме [194, 195].

Для объяснения механизма взаимодействия между инсуляторами на сверхдальних расстояниях предложена модель, согласно которой инсуляторы состоят из сайтов связывания нескольких белков, каждый из которых способен эффективно гомодимеризоваться [16]. Действительно, граница *Msc* из ВХ-С со-

держит сайты связывания белков Pita, dCTCF и еще двух неизвестных инсуляторных белков [143, 196]. Граница *Fab-7* включает сайты связывания GAF, Pita, Insv, Elba, комплекса LBC и нескольких неизвестных белков [57, 143, 157, 197, 198]. В трансгенных линиях парные сайты связывания белков Pita, ZIPIC, Zw5, dCTCF и Su(Hw) обеспечивают дистанционные взаимодействия между репортерным геном и дрожжевым активатором GAL4 [145, 146, 193]. Однако любые комбинации сайтов связывания разных белков приводят к потере взаимодействий между инсуляторами, что подтверждает роль гомодимеризации белков в организации дистанционных взаимодействий.

Кроме того, топология хроматиновых петель определяется взаимной ориентацией двух идентичных инсуляторов. Это было продемонстрировано на трансгенных линиях, где GAL4 не мог активировать транскрипцию находящегося на большом расстоянии гена *white* [146]. Идентичные инсуляторы, помещенные в непосредственной близости от GAL4 и промотора *white*, формировали петли двух различных конфигураций (рис. 5Д). Если инсуляторы находились в противоположной ориентации, то GAL4 активировал промотор гена *white*. Если же инсуляторы были сонаправленными, то формирующаяся петля полностью изолировала GAL4 от промотора. Аналогичные результаты были получены при замене активатора GAL4 на энхансер [28, 187]. Также взаимная ориентация двух инсуляторов *gypsy* влияла на Flp-зависимую рекомбинацию между сайтами FRT [199]. Противоположно ориентированные инсуляторы, расположенные между сайтами FRT, способствовали рекомбинации, а сонаправленные, наоборот, подавляли ее. Скорее всего, гомодимеризация нескольких белков, связанных с идентичными инсуляторами, определяет направление взаимодействия между ними. Топология получившейся в результате петли хроматина регулирует взаимодействия между элементами, расположенными в непосредственной близости от инсуляторов.

### СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОСОМ В ТОПОЛОГИЧЕСКИ АССОЦИИРОВАННЫЕ ДОМЕНЫ

Хромосомы всех высших эукариот организованы в ТАДы. Размеры и способы формирования этих доменов значительно отличаются у разных животных [91, 200, 201]. Формирование ТАДов определяется частотой взаимодействия различных участков хроматина: внутри доменов частота взаимодействий выше, чем между ними. Находящиеся внутри ТАДов инсуляторы могут формировать локальные хроматиновые петли, регулируя энхансер-промоторные взаимодействия (рис. 6).

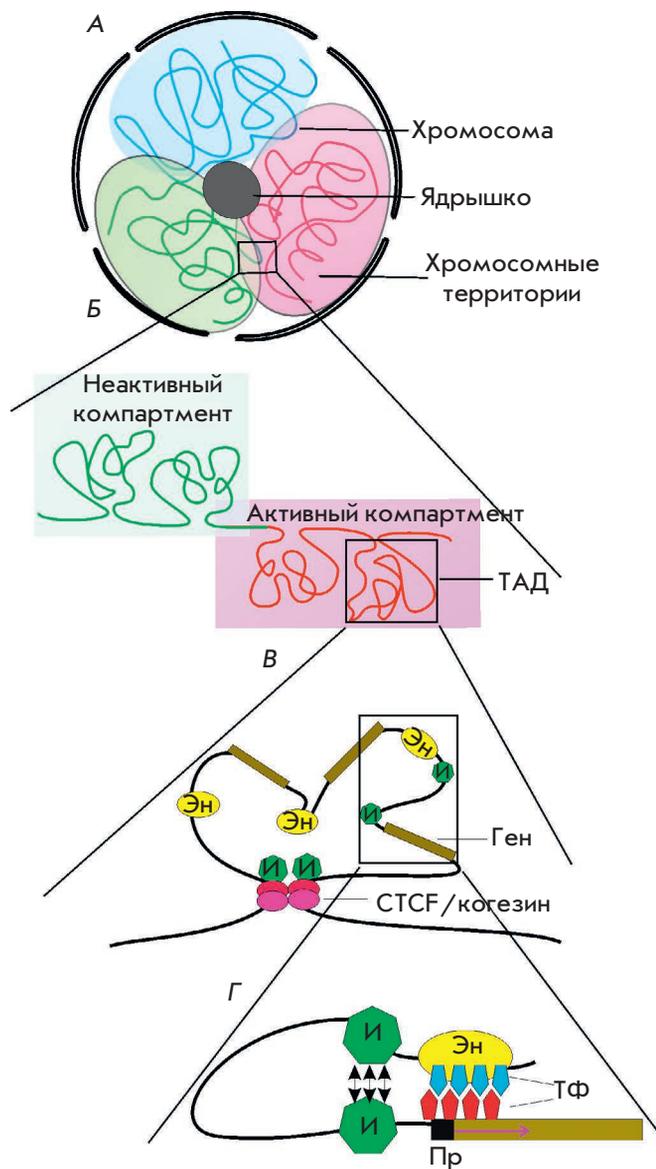
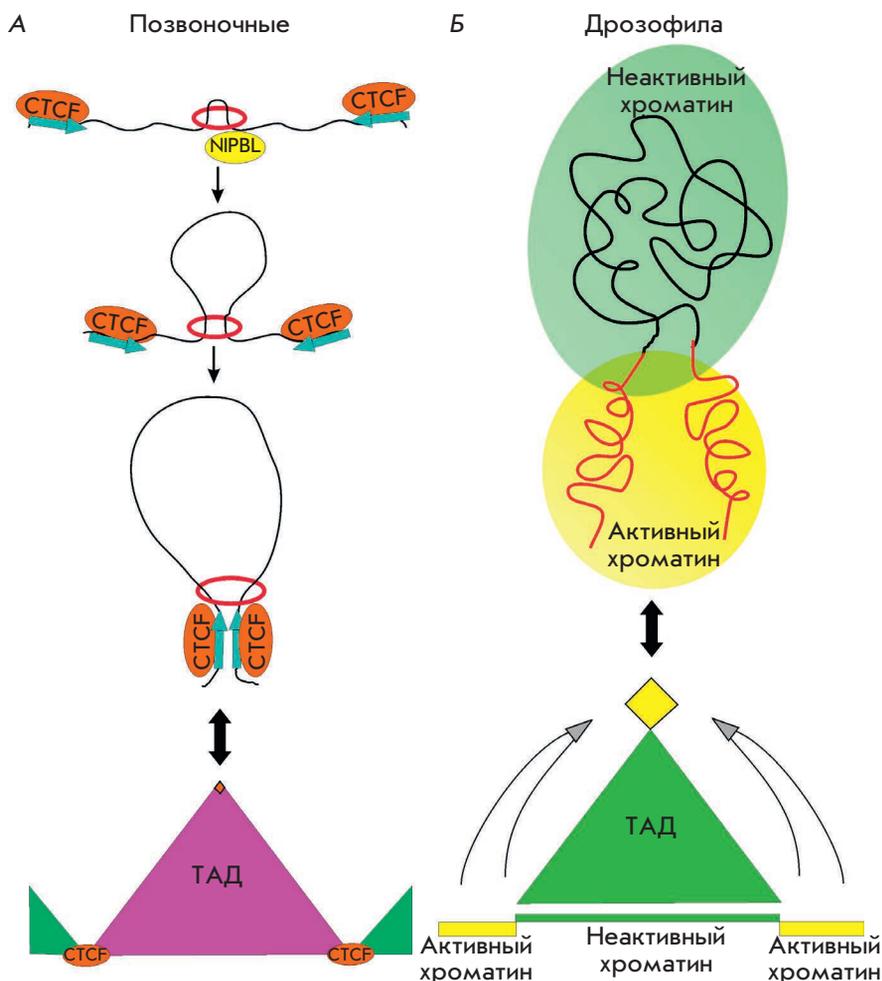


Рис. 6. Уровни организации хроматина в ядре. А – хромосомы внутри ядра занимают определенные территории (красный, зеленый и синий фон). Б – каждая хромосома формирует ТАДы, которые, в зависимости от активного/неактивного состояния хроматина, входят в определенный компартмент ядра. В – ТАДы способствуют сближению регуляторных элементов, находящихся внутри них, и обеспечивают синхронную экспрессию генов. Архитектурные белки способны динамично ограничивать формирующиеся ТАДы. Г – инсуляторы внутри ТАДа могут формировать локальные хроматиновые петли, способствующие специфичным энхансер-промоторным взаимодействиям. Обозначения: ТФ – транскрипционные факторы, остальные обозначения, как на рис. 2



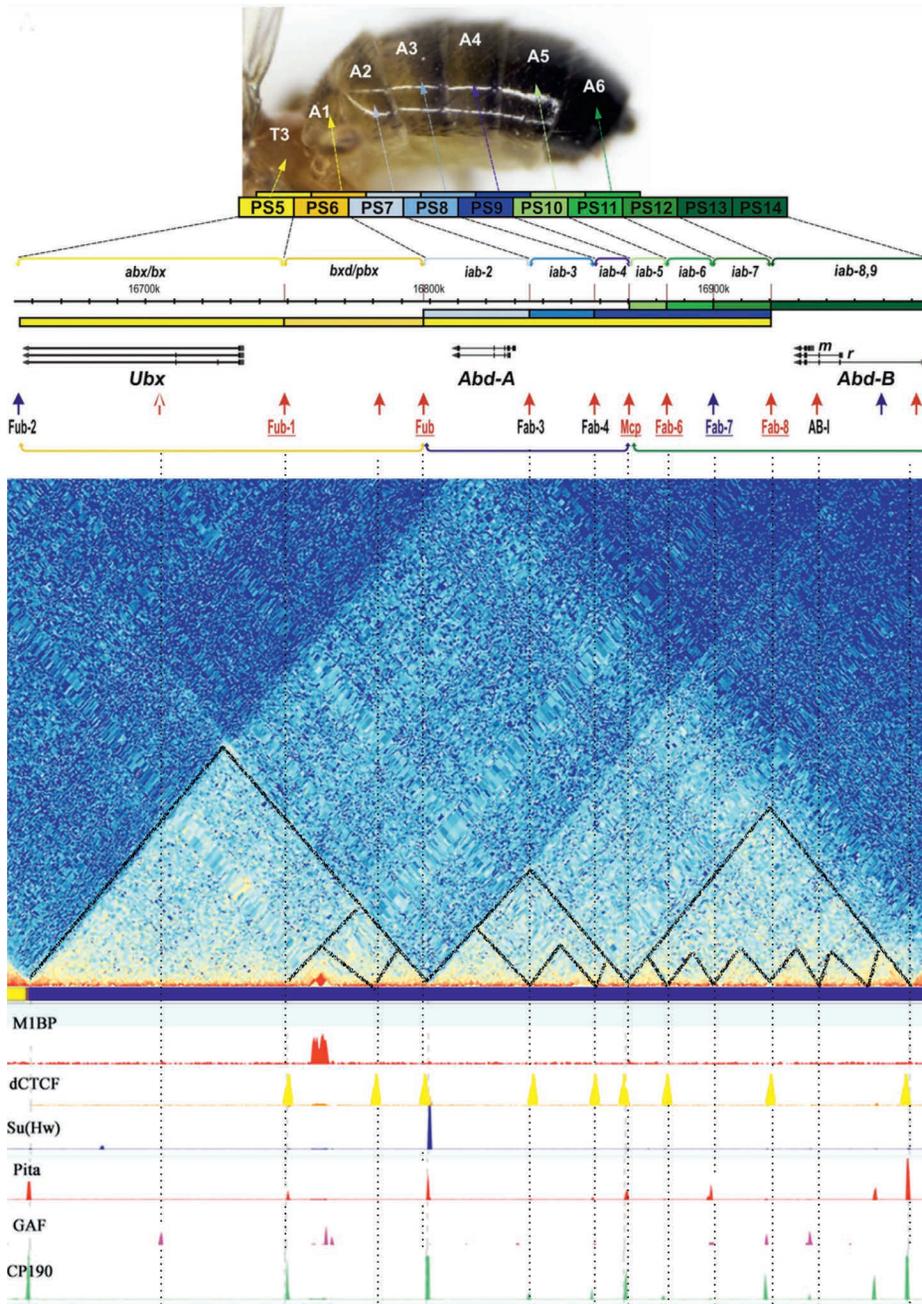
**Рис. 7.** Механизм формирования ТАДов у позвоночных и дрозофилы. А – формирование петли когезиновым комплексом. Когезиновый комплекс (красное кольцо) привлекается на хроматин белком NIPBL и, скользя по хроматину, выпетливает его. Выпетливание хроматина тормозится инвертированными сайтами связывания белка CTCF (обозначены стрелками). Треугольники обозначают соседние ТАДы, разделенные сайтами CTCF. Оранжевый ромб на вершине ТАДа обозначает высокую частоту взаимодействия CTCF-связывающих районов. Б – у дрозофилы активный и неактивный хроматин локализованы в разных компартментах ядра. Неактивный хроматин (зеленый прямоугольник) ограничен районами с активной транскрипцией (желтые прямоугольники). Взаимодействие активно транскрибирующихся районов (показано стрелками) формирует ТАД. Желтый ромб на вершине ТАДа обозначает наибольшую частоту взаимодействия участков активного хроматина

Центральную роль в организации ТАДов у млекопитающих играют белок CTCF и взаимодействующий с ним когезиновый комплекс. Белок CTCF совместно с когезиновым комплексом локализуется примерно на 90% границ ТАДов [89, 90]. Когезиновый комплекс, состоящий из четырех субъединиц (SMC1, SMC3 и RAD21, SCC1), формирует кольцо-подобную структуру вокруг двух молекул ДНК [202]. Считается, что когезиновый комплекс способен выпетливать хроматин, пропуская его через свою кольцо-подобную структуру (рис. 7А). Скользя по хроматину, когезиновый комплекс образует петли, ограничителями которых являются инвертированные относительно друг друга сайты связывания белка CTCF [203–205]. Инактивация CTCF или компонентов когезинового комплекса разрушает большую часть ТАДов, что согласуется с описанной моделью [164, 206, 207]. Слабым местом этой модели является отсутствие экспериментальных данных, подтверждающих способность когезинового комплекса выпетливать хроматин *in vivo* [208].

У млекопитающих роль CTCF-связывающих сайтов в формировании границы ТАДов изучали

на *Hox*-генах мыши [209]. Гены *HoxA* и *HoxC* располагаются в соседних ТАДах и транскрибируются независимо. Делеция района связывания CTCF между этими ТАДами разрушала их границы, что приводило к изменению паттернов экспрессии генов и в результате к гомеозисной трансформации скелета [210]. В отличие от *HoxA* и *HoxC* ген *HoxD* локализован между двух ТАДов, каждый из которых содержит энхансеры, отвечающие за работу *HoxD* в определенном типе ткани. Однако в этом случае делеция CTCF-связывающих сайтов в гене *HoxD* не разрушала границу ТАДов и минимально влияла на паттерн экспрессии гена. Граница ТАДов разрушалась и паттерн экспрессии *HoxD* менялся только при очень значительной делеции, затрагивающей структуру регуляторных районов гена. Эти данные свидетельствуют о возможном участии дополнительных ТФ, кроме CTCF и когезинового комплекса, в формировании границ ТАДов.

У дрозофилы, в отличие от позвоночных, dCTCF и когезиновый комплекс не являются ключевыми факторами формирования ТАДов. Формирующиеся ТАДы хорошо соответствуют эпигенетическим маркерам и подразделяются на классы, соот-



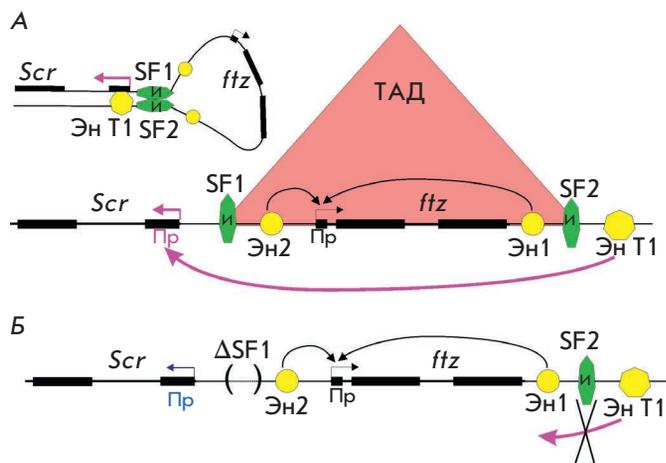
**Рис. 8.** Схематичное изображение ВХ-С. Карта и координаты ВХ-С взяты из ресурса FlyBase (R6.04). Разноцветные прямоугольники обозначают эмбриональные парасегменты (PS), соответствующие сегментам имаго. Регуляторные районы, контролирующие экспрессию генов *Ubx*, *Abd-A* и *Abd-B* (горизонтальные стрелки) в каждом PS обозначены верхними скобками. Регуляторные районы организованы в три транскрипционно ассоциированных района, обозначенные нижними скобками. Паттерн экспрессии каждого гена и уровень его экспрессии представлены в виде цветной шкалы, причем, чем темнее цвет, тем выше уровень экспрессии. Инсуляторы ВХ-С обозначены стрелками: красными – CTCF-зависимые, синими – не зависящие от CTCF [223]. Карта распределения ТАДов и некоторых инсуляторных/архитектурных белков в ВХ-С построена с помощью ресурса ChoroGnome Navigator dm3 [212]

ветствующие специфике хроматина: 1) активные – активно транскрибируются, обогащены модификациями гистонов H3K4me3 и H3K36me3; 2) Polysomb-зависимые обогащены гистоновой модификацией H3K27me3 и белками группы Polysomb; 3) «безмаркерные», или «нулевые», – не имеющие известных специфических гистоновых маркеров; 4) гетерохроматиновые – обогащены маркером H3K9me2 и белками HP1 и Su(var)3-9 [91]. Районы хроматина, разделяющие ТАДы, насыщены генами с высоким уровнем транскрипции [211–213]. Они активно взаимодействуют между собой, формируя петли хроматина. При этом отсутствуют четко выраженные точ-

ки образования ТАДов, такие, как инвертированные сайты CTCF у млекопитающих [211].

Таким образом, у дрозофилы границы ТАДов определяются скорее активным состоянием и свойствами хроматина, чем сайтами связывания конкретного белка [213] (рис. 7Б). Инсуляторные белки dCTCF, CP190, Chromator, Z4 и BEAF-32, связывающиеся с промоторами генов домашнего хозяйства, часто присутствуют на границах ТАДов [201, 211, 212, 214]. Однако роль этих белков в формировании границ ТАДов пока не ясна.

Недавние исследования архитектуры хроматина в индивидуальных клетках млекопитающих вы-



**Рис. 9.** Влияние инсуляторов SF1 и SF2 на формирование ТАДа и транскрипцию в ANT-C. А – границы ТАДа, включающего ген *ftz*, определяются инсуляторами SF1 и SF2. Взаимодействующие инсуляторы формируют петлю, сближающую энхансер T1 с промотором гена *Scr*. Энхансер T1 активирует транскрипцию *Scr*. Б – делеция инсулятора SF1 (показана скобкой) разрушает ТАД, что не влияет на экспрессию гена *ftz*. Однако энхансер T1 не активирует транскрипцию *Scr*, так как петля между инсуляторами не формируется. Все обозначения, как на рис. 2

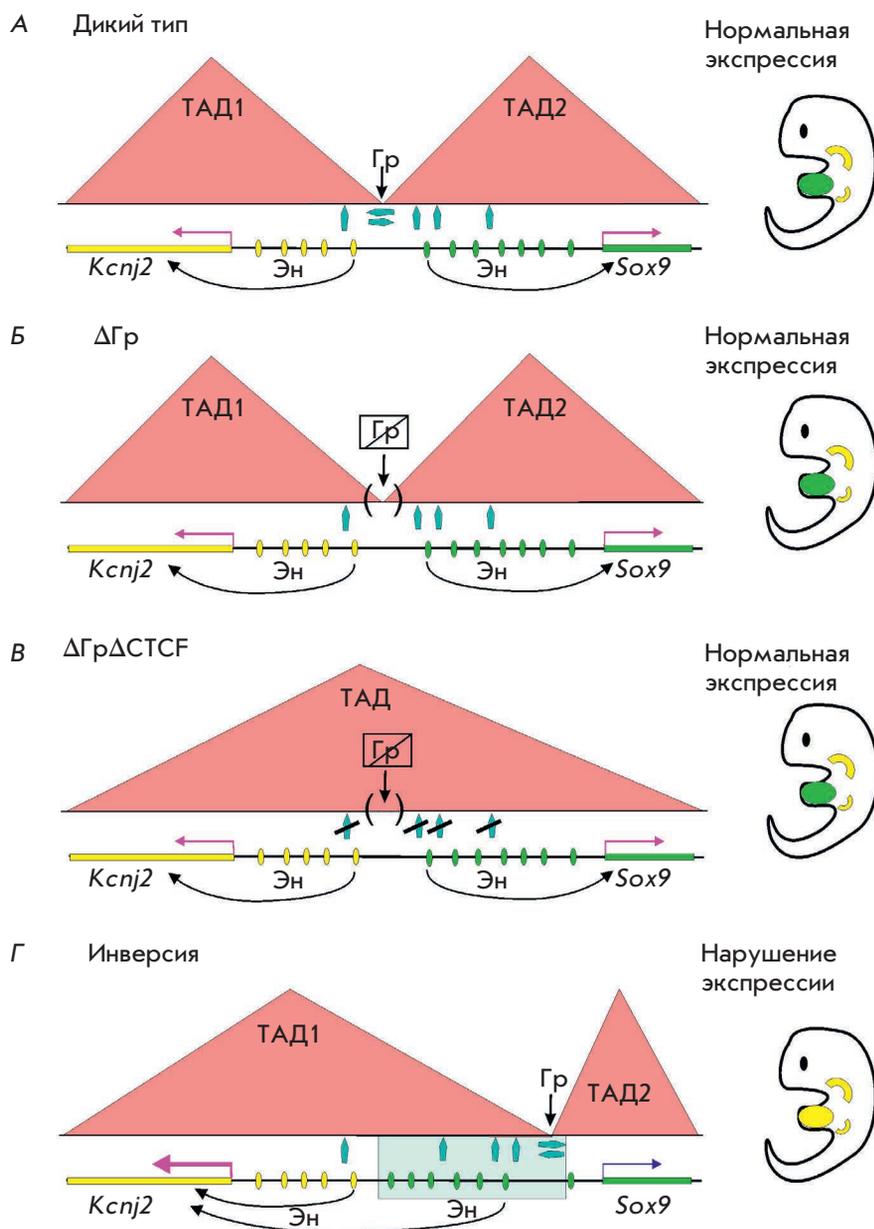
явили высокую гетерогенность локализации границ ТАДов [215–218]. При этом участки ДНК внутри ТАДов взаимодействуют в среднем только в 2–3 раза чаще, чем участки ДНК из соседних ТАДов [89]. Трансграничные взаимодействия были подтверждены с помощью FISH-анализа [219, 220]. Эти результаты согласуются с интенсивной динамикой связывания/диссоциации белка CTCF, который находится на хроматине примерно 2 мин [221]. Таким образом, формирование ТАДов представляет собой динамичный процесс, а границы ТАДов не являются жестким барьером, ограничивающим энхансер-промоторные взаимодействия.

### РОЛЬ ИНСУЛЯТОРОВ И ТАДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Инсуляторы дрозофилы играют значительную роль в обеспечении специфичных дистанционных *цис*-регуляторных взаимодействий, что хорошо продемонстрировано на примере ВХ-С [222]. Гомеозисные гены *Ubx*, *Abd-A* и *Abd-B*, входящие в ВХ-С, отвечают за формирование третьего грудного и всех абдоминальных сегментов мухи, определяя ось ее развития от головы к брюшку. ВХ-С разделен на девять регуляторных доменов (*iab* 1–9), каждый из которых активирует специфичную транскрипцию одного из трех гомеозисных генов в определенном сегменте

(рис. 8). В составе ВХ-С выделяют два ТАДа, общая граница которых совпадает с инсулятором *Fub*, расположенным между регуляторными областями генов *Ubx* и *Abd-A* [217] (рис. 8). Наиболее исследованы инсуляторы *Mcp*, *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8*. Они определяют границы доменов *iab-5*, *iab-6* и *iab-7*, контролирующих уровень экспрессии *Abd-B* в брюшных сегментах А5, А6 и А7 [222, 223]. Вся регуляторная область гена *Abd-B* локализована внутри одного ТАДа. В сегменте А5 энхансеры *iab-5* активны, в то время как энхансеры *iab-6* и *iab-7* находятся в неактивном состоянии. В следующем сегменте А6 функционируют энхансеры *iab-6*, сильнее активирующие экспрессию *Abd-B*. В сегменте А7 работают еще более сильные энхансеры *iab-7*. Таким образом, в каждом последующем сегменте экспрессия *Abd-B* усиливается, что определяет правильное развитие каждого брюшного сегмента. Взаимодействия между соседними регуляторными доменами блокируются инсуляторами. Например, при делеции инсулятора *Fab-6* наблюдается преждевременная активность энхансеров *iab-6* в сегменте А5.

Генное редактирование *in vivo* позволило детально изучить структуру и функции инсуляторов на границах ВХ-С. Оказалось, что инсуляторы состоят из двух модулей, один из которых блокирует коммуникацию между соседними регуляторными доменами (инсуляторный модуль), а второй обеспечивает специфичное взаимодействие между инсулятором и промотором гена *Abd-B* (коммуникаторный модуль) [224, 225]. В локальной инсуляции регуляторных элементов, находящихся в соседних доменах, участвуют белки Su(Hw), Pita и dCTCF, а также взаимодействующий с ними белок CP190 [143, 196, 226] (рис. 8). Инсуляторный модуль может состоять из любой комбинации сайтов связывания этих белков, но количество сайтов не должно быть меньше четырех. Коммуникаторный модуль всех инсуляторов содержит сайты связывания малоизученного комплекса LBC, включающего белки GAF и CLAMP [198, 224]. Коммуникаторные модули взаимодействуют с предпромоторной областью гена *Abd-B* и формируют хроматиновые петли, обеспечивающие специфичные контакты между энхансерами *iab* и промотором *Abd-B*. В эмбриональных клеточных популяциях найдены субТАДы, которые соответствуют отдельным *iab*-доменам [217]. Формирование субТАДов коррелирует с активацией *iab*-доменов, что, вероятно, отражает взаимодействия активных доменов с промотором *Abd-B*. Этот факт подтверждает, что у дрозофилы формирование ТАДов происходит за счет взаимодействия участков активного хроматина, в то время как инсуляторные белки стабилизируют границы сформированных доменов.



**Рис. 10.** Влияние ТАДов на экспрессию локусов *Kcnj2* и *Sox9*. А – нормальная экспрессия генов *Kcnj2* и *Sox9*. Образуются два отдельных ТАДа, граница (Гр) между которыми колокализуются с инвертированными сайтами связывания белка СТCF. Б – делеция СТCF-связывающих сайтов на границе ТАДов не разрушает их и не влияет на паттерны экспрессии генов. В – одновременная делеция граничных и внутренних сайтов СТCF приводит к слиянию ТАДов, но не влияет на экспрессию генов. Г – перемещение границы ТАДов приводит к неправильной экспрессии генов. Обозначения: синие стрелки – сайты связывания СТCF; паттерны экспрессии генов *Kcnj2* и *Sox9* в эмбрионе обозначены желтым и зеленым соответственно; направление действия энхансеров указано стрелками; остальные обозначения, как на рис. 2 и 9

Формирование/разрушение ТАДов может лишь минимально влиять на экспрессию генов [164, 206, 227]. Например, в комплексе гомеозисных генов ANТ-С границы ТАДа определяют два инсулятора, SF1 и SF2 [53, 228] (рис. 9А). Делеция инсулятора SF1 разрушает ТАД, что никак не влияет на экспрессию расположенного внутри ТАДа гена *fushi-tarazu* (*ftz*). Интересно, что при этом снижается транскрипция соседнего с ТАДом гена *Scr* [229] (рис. 9Б). В ранних эмбрионах находящийся с одной стороны от ТАДа ген *Scr* активируется, непосредственно взаимодействуя с энхансером T1, находящимся с другой стороны ТАДа [230] (рис. 9А). Таким образом, взаимодействующие инсуляторы SF1 и SF2 на границах ТАДа сближают энхансер T1 и ген *Scr*. Эта ситуация

полностью реализует разработанную на трансгенных линиях модель, согласно которой выпетливание хроматина между дистанцированными инсуляторами способствует энхансер-промоторному взаимодействию и активации транскрипции.

Также, влияние границ ТАДов на транскрипцию изучали точно делетируя различные сайты связывания СТCF в локусе *Sox9-Kcnj2* мыши [231]. В этом локусе локализованы два ТАДа, разделенные границей, содержащей инвертированные СТCF-связывающие сайты (рис. 10А). Также внутри каждого ТАДа присутствуют несколько дополнительных сайтов СТCF. Гены *Sox9* и *Kcnj2* активируются специфичными энхансерами и имеют разные паттерны экспрессии. Делеция сайтов СТCF на гра-

нице между *Sox9* и *Kcnj2* не приводила к слиянию ТАДов (рис. 10Б). Образование единого ТАДа наблюдалось только при дополнительном вырезании внутренних сайтов СТСФ (рис. 10В). Примечательно, что при слиянии ТАДов энхансеры не активировали неспецифичный ген, и экспрессия генов *Sox9* и *Kcnj2* практически не изменялась. Вероятно, высокая специфичность энхансер-промоторных взаимодействий не позволяла когезиновому комплексу формировать новые контакты между регуляторными элементами в общем локусе *Sox9-Kcnj2*. Таким образом, граница между ТАДами не участвовала в организации специфичных энхансер-промоторных взаимодействий. При инверсии, перемещающей границу ТАДов в позицию между энхансерами *Sox9* и его промотором, формировались два новых домена (рис. 10Г). В этом случае граница ТАДов оказывала критичное влияние на транскрипцию. Изолированные от промотора энхансеры *Sox9* не могли активировать специфичный ген, но активировали *Kcnj2*, что приводило к летальному эффекту.

Перечисленные примеры позволяют сделать вывод, что организация хромосом в топологические структуры и специфичные энхансер-промоторные взаимодействия – два различных и часто независимых уровня регуляции транскрипции. Только в некоторых случаях границы ТАДов функционируют как инсуляторы, регулирующие взаимодействия между энхансерами и промоторами.

Корреляцию между экспрессией генов и нарушениями в архитектуре хроматина изучали также на линиях дрозофил, несущих хромосомы с множественными инверсиями и делециями [232]. Оказалось, что значительные изменения в организации ТАДов лишь слабо влияют на транскрипцию генов. Эти дан-

ные еще раз говорят о второстепенной роли ТАДов в регуляции экспрессии генов высших эукариот.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время становится очевидным, что ТАДы формируют архитектуру хромосом, но не являются транскрипционными доменами, регулирующими генную экспрессию. У дрозофилы большинство границ ТАДов сформировано промоторами активно транскрибирующихся генов. В некоторых случаях границы ТАДов совпадают с инсуляторами. Интересно, что многие белки, связывающиеся с инсуляторами, также входят в состав комплексов, собирающихся на промоторах. Инсуляторы являются многофункциональными регуляторными элементами. Они обеспечивают специфичность энхансер-промоторных взаимодействий, формируют границы между активным и неактивным хроматином, создают области открытого доступного для ТФ хроматина. Экспериментальные данные демонстрируют, что инсуляторы блокируют активность энхансеров, непосредственно взаимодействуя с энхансерами или промоторами. Сформированные инсуляторами хроматиновые петли играют в инсуляции лишь вспомогательную роль. Вопрос о том, как устанавливаются и регулируются дистанционные взаимодействия между энхансерами, сайленсерами, промоторами и инсуляторами, пока еще остается открытым. Несомненно, что значительную роль в этом процессе играют инсуляторные белки. Однако механизм их действия нуждается в дальнейшем изучении. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00295).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Field A., Adelman K. // *Annu. Rev. Biochem.* 2020. V. 89. P. 213–234.
- Klemm S.L., Shipony Z., Greenleaf W.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. № 4. P. 207–220.
- Schoenfelder S., Fraser P. // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. № 8. P. 437–455.
- Frankel N., Davis G.K., Vargas D., Wang S., Payre F., Stern D.L. // *Nature.* 2010. V. 466. № 7305. P. 490–493.
- Lettice L.A., Williamson I., Devenney P.S., Kilanowski F., Dorin J., Hill R.E. // *Development.* 2014. V. 141. № 8. P. 1715–1725.
- Benyajati C., Worcel A. // *Cell.* 1976. V. 9. № 3. P. 393–407.
- Geyer P.K., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 10. P. 1865–1873.
- Kellum R., Schedl P. // *Cell.* 1991. V. 64. № 5. P. 941–950.
- Kellum R., Schedl P. // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. № 5. P. 2424–2431.
- Phillips J.E., Corces V.G. // *Cell.* 2009. V. 137. № 7. P. 1194–1211.
- Wallace J.A., Felsenfeld G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007. V. 17(5). P. 400–407.
- Ali T., Renkawitz R., Bartkuhn M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016. V. 37. P. 17–26.
- Chetverina D., Fujioka M., Erokhin M., Georgiev P., Jaynes J.B., Schedl P. // *Bioessays.* 2017. V. 39. № 3. doi: 10.1002/bies.201600233.
- Ghirlando R., Felsenfeld G. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 8. P. 881–891.
- Hnisz D., Day D.S., Young R.A. // *Cell.* 2016. V. 167. № 5. P. 1188–1200.
- Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 1. P. 8–14.
- Matzat L.H., Lei E.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1839. № 3. P. 203–214.
- Chen D., Lei E.P. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2019. V. 58. P. 61–68.
- Spradling A.C., Stern D.M., Kiss I., Roote J., Laverty T., Rubin G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 24. P. 10824–10830.
- Carlson C.M., Largaespada D.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6.

- № 7. P. 568–580.
21. Jiang F., Doudna J.A. // *Annu. Rev. Biophys.* 2017. V. 46. P. 505–529.
  22. Pirrotta V., Steller H., Bozzetti M.P. // *EMBO J.* 1985. V. 4. № 13A. P. 3501–3508.
  23. Levis R., Hazelrigg T., Rubin G.M. // *Science.* 1985. V. 229. № 4713. P. 558–561.
  24. Silicheva M., Golovnin A., Pomerantseva E., Parshikov A., Georgiev P., Maksimenko O. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 1. P. 39–47.
  25. Udvardy A., Maine E., Schedl P. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 185. № 2. P. 341–358.
  26. Kuhn E.J., Hart C.M., Geyer P.K. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 4. P. 1470–1480.
  27. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 16. P. 2098–2107.
  28. Kyrchanova O., Leman D., Parshikov A., Fedotova A., Studitsky V., Maksimenko O., Georgiev P. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. e62690.
  29. Vazquez J., Schedl P. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 24. P. 5984–5993.
  30. Zhao K., Hart C.M., Laemmli U.K. // *Cell.* 1995. V. 81. № 6. P. 879–889.
  31. Modolell J., Bender W., Meselson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 6. P. 1678–1682.
  32. Kim J., Shen B., Rosen C., Dorsett D. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 7. P. 3381–3392.
  33. Bender W., Akam M., Karch F., Beachy P.A., Peifer M., Spierer P., Lewis E.B., Hogness D.S. // *Science.* 1983. V. 221. № 4605. P. 23–29.
  34. Hoover K.K., Gerasimova T.I., Chien A.J., Corces V.G. // *Genetics.* 1992. V. 132. № 3. P. 691–697.
  35. Parkhurst S.M., Harrison D.A., Remington M.P., Spana C., Kelley R.L., Coyne R.S., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1988. V. 2. № 10. P. 1205–1215.
  36. Peifer M., Bender W. // *EMBO J.* 1986. V. 5. № 9. P. 2293–3203.
  37. Geyer P.K., Green M.M., Corces V.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 22. P. 8593–8597.
  38. Smith P.A., Corces V.G. // *Genetics.* 1995. V. 139. № 1. P. 215–228.
  39. Geyer P.K., Spana C., Corces V.G. // *EMBO J.* 1986. V. 5. № 10. P. 2657–2662.
  40. Parkhurst S.M., Corces V.G. // *Mol. Cell. Biol.* 1986. V. 6. № 1. P. 47–53.
  41. Mallin D.R., Myung J.S., Patton J.S., Geyer P.K. // *Genetics.* 1998. V. 148. № 1. P. 331–339.
  42. Sigrist C.J., Pirrotta V. // *Genetics.* 1997. V. 147. № 1. P. 209–221.
  43. Conte C., Dastugue B., Vaury C. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 6. P. 1767–1777.
  44. Brassat E., Hermant C., Jensen S., Vaury C. // *Gene.* 2010. V. 450. № 1. P. 25–31.
  45. Golovnin A., Biryukova I., Romanova O., Silicheva M., Parshikov A., Savitskaya E., Pirrotta V., Georgiev P. // *Development.* 2003. V. 130. № 14. P. 3249–3258.
  46. Parnell T.J., Viering M.M., Skjesol A., Helou C., Kuhn E.J., Geyer P.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 23. P. 13436–13441.
  47. Negre N., Brown C.D., Shah P.K., Kheradpour P., Morrison C.A., Henikoff J.G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White R.A., et al. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 1. e1000814.
  48. Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., et al. // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 11. P. 2188–2198.
  49. Soshnev A.A., Ishimoto H., McAllister B.F., Li X., Wehling M.D., Kitamoto T., Geyer P.K. // *Genetics.* 2011. V. 189. № 2. P. 455–468.
  50. Scott K.C., Taubman A.D., Geyer P.K. // *Genetics.* 1999. V. 153. № 2. P. 787–798.
  51. Melnikova L., Kostyuchenko M., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 2. e0193497.
  52. Belozero V.E., Majumder P., Shen P., Cai H.N. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 12. P. 3113–3121.
  53. Li M., Ma Z., Liu J.K., Roy S., Patel S.K., Lane D.C., Cai H.N. // *Mol. Cell. Biol.* 2015. V. 35. № 23. P. 4018–4029.
  54. Vazquez J., Schedl P. // *Genetics.* 2000. V. 155. № 3. P. 1297–1311.
  55. Chetverina D., Savitskaya E., Maksimenko O., Melnikova L., Zaytseva O., Parshikov A., Galkin A.V., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 3. P. 929–937.
  56. Sultana H., Verma S., Mishra R.K. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 9. P. 3543–3557.
  57. Aoki T., Sarkeshik A., Yates J., Schedl P. // *Elife.* 2012. V. 1. e00171.
  58. Barges S., Mihaly J., Galloni M., Hagstrom K., Muller M., Shanower G., Schedl P., Gyurkovics H., Karch F. // *Development.* 2000. V. 127. № 4. P. 779–790.
  59. Gruzdeva N., Kyrchanova O., Parshikov A., Kullyev A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 9. P. 3682–3689.
  60. Gyurkovics H., Gausz J., Kummer J., Karch F. // *EMBO J.* 1990. V. 9. № 8. P. 2579–2585.
  61. Hogga I., Mihaly J., Barges S., Karch F. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 5. P. 1145–1151.
  62. Iampietro C., Cleard F., Gyurkovics H., Maeda R.K., Karch F. // *Development.* 2008. V. 135. № 24. P. 3983–3987.
  63. Iampietro C., Gummalla M., Mutero A., Karch F., Maeda R.K. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 12. e1001260.
  64. Rodin S., Kyrchanova O., Pomerantseva E., Parshikov A., Georgiev P. // *Genetics.* 2007. V. 177. № 1. P. 113–121.
  65. Schweinsberg S.E., Schedl P. // *Development.* 2004. V. 131. № 19. P. 4743–4749.
  66. Ciavatta D., Rogers S., Magnuson T. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 373. № 2. P. 233–239.
  67. Hagstrom K., Muller M., Schedl P. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 2. P. 3202–3215.
  68. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa M.K., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., et al. // *Genome Res.* 2015. V. 25. № 1. P. 89–99.
  69. Perez-Lluch S., Cuartero S., Azorin F., Espinas M.L. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 21. P. 6926–6933.
  70. Schweinsberg S., Hagstrom K., Gohl D., Schedl P., Kumar R.P., Mishra R., Karch F. // *Genetics.* 2004. V. 168. № 3. P. 1371–1384.
  71. Zhou J., Barolo S., Szymanski P., Levine M. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 24. P. 3195–3201.
  72. Chung J.H., Whiteley M., Felsenfeld G. // *Cell.* 1993. V. 74. № 3. P. 505–514.
  73. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // *Cell.* 1999. V. 98. № 3. P. 387–396.
  74. Arzate-Mejia R.G., Recillas-Targa F., Corces V.G. // *Development.* 2018. V. 145. № 6.
  75. Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development.* 2012. V. 139. № 6. P. 1045–1057.
  76. Bell A.C., Felsenfeld G. // *Nature.* 2000. V. 405. № 6785. P. 482–485.
  77. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. // *Nature.* 2000. V. 405. № 6785. P. 486–489.

78. Kanduri C., Pant V., Loukinov D., Pugacheva E., Qi C.F., Wolffe A., Ohlsson R., Lobanenkov V.V. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 14. P. 853–856.
79. Dorsett D. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999. V. 9. № 5. P. 505–514.
80. Geyer P.K. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997. V. 7. № 2. P. 242–248.
81. Liu G., Dean A. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2019. V. 1862. № 6. P. 625–633.
82. Morcillo P., Rosen C., Baylies M.K., Dorsett D. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. № 20. P. 2729–2740.
83. Gause M., Morcillo P., Dorsett D. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. № 14. P. 4807–4817.
84. Torigoi E., Bennani-Baiti I.M., Rosen C., Gonzalez K., Morcillo P., Ptashne M., Dorsett D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 6. P. 2686–2691.
85. Gerasimova T.I., Corces V.G. // *Annu. Rev. Genet.* 2001. V. 35. P. 193–208.
86. Gerasimova T.I., Byrd K., Corces V.G. // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. № 5. P. 1025–1035.
87. Valenzuela L., Kamakaka R.T. // *Annu. Rev. Genet.* 2006. V. 40. P. 107–138.
88. Boettiger A., Murphy S. // *Trends Genet.* 2020. V. 36. № 4. P. 273–287.
89. Chang L.H., Ghosh S., Noordermeer D. // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. № 3. P. 643–652.
90. Sikorska N., Sexton T. // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. № 3. P. 653–664.
91. Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 4. eaaw1668.
92. Harrison D.A., Gdula D.A., Coyne R.S., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 10. P. 1966–1978.
93. Baxley R.M., Bullard J.D., Klein M.W., Fell A.G., Morales-Rosado J.A., Duan T., Geyer P.K. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4463–4478.
94. Soshnev A.A., He B., Baxley R.M., Jiang N., Hart C.M., Tan K., Geyer P.K. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 12. P. 5415–5431.
95. Georgiev P., Kozycina M. // *Genetics.* 1996. V. 142. № 2. P. 425–436.
96. Duan T., Geyer P.K. // *Genetics.* 2018. V. 209. № 3. P. 757–772.
97. Melnikova L., Elizar'ev P., Erokhin M., Molodina V., Chetverina D., Kostyuchenko M., Georgiev P., Golovnin A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 5314.
98. Soshnev A.A., Baxley R.M., Manak J.R., Tan K., Geyer P.K. // *Development.* 2013. V. 140. № 17. P. 3613–3623.
99. Buchner K., Roth P., Schotta G., Krauss V., Saumweber H., Reuter G., Dorn R. // *Genetics.* 2000. V. 155. № 1. P. 141–157.
100. Gerasimova T.I., Gdula D.A., Gerasimov D.V., Simonova O., Corces V.G. // *Cell.* 1995. V. 82. № 4. P. 587–597.
101. Zollman S., Godt D., Prive G.G., Couderc J.L., Laski F.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 22. P. 10717–10721.
102. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 412. № 3. P. 423–436.
103. Ghosh D., Gerasimova T.I., Corces V.G. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 10. P. 2518–2527.
104. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. // *Open Biol.* 2017. V. 7. № 10. P. 170150.
105. Oliver D., Sheehan B., South H., Akbari O., Pai C.Y. // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 101.
106. Plevock K.M., Galletta B.J., Slep K.C., Rusan N.M. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. e0144174.
107. Vogelmann J., Le Gall A., Dejardin S., Allemand F., Gamot A., Labesse G., Cuvier O., Negre N., Cohen-Gonsaud M., Margeat E., et al. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004544.
108. Pai C.Y., Lei E.P., Ghosh D., Corces V.G. // *Mol. Cell.* 2004. V. 16. № 5. P. 737–748.
109. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. // *Chromosoma.* 2018. V. 127. № 1. P. 59–71.
110. Golovnin A., Mazur A., Kopantseva M., Kurshakova M., Gulak P.V., Gilmore B., Whitfield W.G., Geyer P., Pirrotta V., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 3. P. 963–974.
111. Nègre N., Brown C.D., Ma L., Bristow C.A., Miller S.W., Wagner U., Kheradpour P., Eaton M.L., Loriaux P., Sealfon R., et al. // *Nature.* 2011. V. 471. № 7339. P. 527–531.
112. Alekseyenko A.A., Gorchakov A.A., Zee B.M., Fuchs S.M., Kharchenko P.V., Kuroda M.I. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 13. P. 1445–1460.
113. Caron C., Pivot-Pajot C., van Grunsven L.A., Col E., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S. // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. № 9. P. 877–882.
114. Lahn B.T., Tang Z.L., Zhou J., Barndt R.J., Parvinen M., Allis C.D., Page D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 13. P. 8707–8712.
115. Melnikova L., Molodina V., Erokhin M., Georgiev P., Golovnin A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19102.
116. Glenn S.E., Geyer P.K. // *G3 (Bethesda).* 2019. V. 9. № 2. P. 345–357.
117. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // *Mol. Cell.* 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
118. Maksimenko O., Kyrchanova O., Bonchuk A., Stakhov V., Parshikov A., Georgiev P. // *Epigenetics.* 2014. V. 9. № 9. P. 1261–1270.
119. King M.R., Matzat L.H., Dale R.K., Lim S.J., Lei E.P. // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. № 13. P. 2956–2966.
120. Matzat L.H., Dale R.K., Moshkovich N., Lei E.P. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 11. P. e1003069.
121. Lei E.P., Corces V.G. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. № 8. P. 936–941.
122. Golovnin A., Melnikova L., Shapovalov I., Kostyuchenko M., Georgiev P. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 10. e0140991.
123. Golovnin A., Melnikova L., Volkov I., Kostyuchenko M., Galkin A.V., Georgiev P. // *EMBO Rep.* 2008. V. 9. № 5. P. 440–445.
124. Golovnin A., Volkov I., Georgiev P. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. № 8. P. 2064–2074.
125. Gerasimova T.I., Lei E.P., Bushey A.M., Corces V.G. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. № 5. P. 61–72.
126. Wasser M., Chia W. // *PLoS One.* 2007. V. 2. № 5. e412.
127. Melnikova L., Shapovalov I., Kostyuchenko M., Georgiev P., Golovnin A. // *Chromosoma.* 2017. V. 126. № 2. P. 299–311.
128. Iuchi S. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. № 4. P. 625–635.
129. Najafabadi H.S., Mnaimneh S., Schmitges F.W., Garton M., Lam K.N., Yang A., Albu M., Weirauch M.T., Radovani E., Kim P.M., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 5. P. 555–562.
130. Razin S.V., Borunova V.V., Maksimenko O.G., Kantidze O.L. // *Biochemistry (Moscow)* 2012. V. 77. № 3. P. 217–226.
131. Heger P., Marin B., Bartkuhn M., Schierenberg E., Wiehe T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 43. P. 17507–17512.
132. Wendt K.S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi, S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., et al. // *Nature.* 2008. V. 451. № 7180. P. 796–801.
133. Heath H., Ribeiro de Almeida C., Sleutels F., Dingjan G., van de Nobelen S., Jonkers I., Ling K.W., Gribnau J., Renkawitz R., Grosveld F., et al. // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 21. P. 2839–2850.
134. Soshnikova N., Montavon T., Leleu M., Galjart N., Duboule D. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. № 6. P. 819–830.

135. Splinter E., Heath H., Kooren J., Palstra R.J., Klous P., Grosveld F., Galjart N., de Laat W., et al. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 17. P. 2349–2354.
136. Moon H., Filippova G., Loukinov D., Pugacheva E., Chen Q., Smith S.T., Munhall A., Grewe B., Bartkuhn M., Arnold R., et al. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. № 2. P. 165–170.
137. Hashimoto H., Wang D., Horton J.R., Zhang X., Corces V.G., Cheng X. // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. № 5. P. 711–720 e3.
138. Nakahashi H., Kieffer Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. № 5. P. 1678–1689.
139. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., Boyko K., Popov V., Maksimenko O., Georgiev P. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 2677.
140. Li Y., Haarhuis J.H.I., Sedenno Cacciatore A., Oldenkamp R., van Ruiten M.S., Willems L., Teunissen H., Muir K.W., de Wit E., Rowland B.D., et al. // *Nature.* 2020. V. 578. № 7795. P. 472–476.
141. Parelho V., Hadjur S., Spivakov M., Leleu M., Sauer S., Gregson H.C., Jarmuz A., Canzonetta C., Webster Z., Nesterova T., et al. // *Cell.* 2008. V. 132. № 3. P. 422–433.
142. Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.
143. Kyrchanova O., Zolotarev N., Mogila V., Maksimenko O., Schedl P., Georgiev P. // *Development.* 2017. V. 144. № 14. P. 2663–2672.
144. Page A.R., Kovacs A., Deak P., Torok T., Kiss I., Dario P., Bastos C., Batista P., Gomes R., Ohkura H., et al. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 24. P. 4304–4315.
145. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., Bonchuk A., Penin A.A., Lando A.S., Eliseeva I.A., Kulakovskiy I.V., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241.
146. Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 22. P. 7019–7028.
147. Espinas M.L., Jimenez-Garcia E., Vaquero A., Canudas S., Bernues J., Azorin F. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 23. P. 16461–16469.
148. Lu Q., Wallrath L.L., Granok H., Elgin S.C. // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 5. P. 2802–2814.
149. Bartoletti M., Rubin T., Chalvet F., Netter S., Dos Santos N., Poisot E., Paces-Fessy M., Cumenal D., Peronnet F., Pret A.M., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. e49958.
150. Melnikova L., Juge F., Gruzdeva N., Mazur A., Cavalli G., Georgiev P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 41. P. 14806–14811.
151. Pagans S., Ortiz-Lombardia M., Espinas M.L., Bernues J., Azorin F. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 20. P. 4406–4413.
152. Hart C.M., Zhao K., Laemmli U.K. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. № 2. P. 999–1009.
153. Gilbert M.K., Tan Y.Y., Hart C.M. // *Genetics.* 2006. V. 173. № 3. P. 1365–1375.
154. Emberly E., Blattes R., Schuettengruber B., Hennion M., Jiang N., Hart C.M., Kas E., Cuvier O. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 12. P. 2896–2910.
155. Jiang N., Emberly E., Cuvier O., Hart C.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 13. P. 3556–3568.
156. Cuartero S., Fresan U., Reina O., Planet E., Espinas M.L. // *EMBO J.* 2014. V. 33. № 6. P. 637–647.
157. Fedotova A., Aoki T., Rossier M., Mishra R.K., Clendinen C., Kyrchanova O., Wolle D., Bonchuk A., Maeda R.K., Mutter A., et al. // *Genetics.* 2018. V. 210. № 2. P. 573–585.
158. Dai Q., Ren A., Westholm J.O., Duan H., Patel D.J., Lai E.C. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 1. P. 48–62.
159. Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B., Renkawitz R. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 7. P. 877–888.
160. Bushey A.M., Ramos E., Corces V.G. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 11. P. 1338–1350.
161. Mohan M., Bartkuhn M., Herold M., Philippen A., Heindl N., Bardenhagen I., Leers J., White R.A., Renkawitz-Pohl R., Saumweber H., et al. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 19. P. 4203–4214.
162. Liang J., Lacroix L., Gamot A., Cuddapah S., Queille S., Lhoumaud P., Lepetit P., Martin P.G., Vogelmann J., Court F., et al. // *Mol. Cell.* 2014. V. 53. № 4. P. 672–681.
163. Ahanger S.H., Gunther K., Weth O., Bartkuhn M., Bionde R.R., Shouche Y.S., Renkawitz R. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 3917.
164. Nora E.P., Goloborodko A., Valton A.L., Gibcus J.H., Uebersohn A., Abdennur N., Dekker J., Mirny L.A., Bruneau B.G. // *Cell.* 2017. V. 169. № 5. P. 930–944 e22.
165. Golovnin A., Melnick E., Mazur A., Georgiev P. // *Genetics.* 2005. V. 170. № 3. P. 1133–1142.
166. Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730.
167. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Development.* 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106.
168. Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 7. P. e1003606.
169. Holohan E.E., Kwong C., Adryan B., Bartkuhn M., Herold M., Renkawitz R., Russell S., White R. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 7. P. e112.
170. Maksimenko O., Golovnin A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 17. P. 5469–5477.
171. Melnikova L., Elizar'ev P., Erokhin M., Molodina V., Chetverina D., Kostyuchenko M., Georgiev P., Golovnin A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 5314.
172. Melnikova L., Kostyuchenko M., Silicheva M., Georgiev P. // *Chromosoma.* 2008. V. 117. № 2. P. 137–145.
173. Kostyuchenko M., Savitskaya E., Koryagina E., Melnikova L., Karakozova M., Georgiev P. // *Chromosoma.* 2009. V. 118. № 5. P. 665–674.
174. Qian S., Varjavand B., Pirrotta V. // *Genetics.* 1992. V. 131. № 1. P. 79–90.
175. Handoko L., Xu H., Li G., Ngan C.Y., Chew E., Schnapp M., Lee C.W., Ye C., Ping J.L., Mulawadi F., et al. // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 7. P. 630–638.
176. Sanyal A., Lajoie B.R., Jain G., Dekker J. // *Nature.* 2012. V. 489. № 7414. P. 109–113.
177. Liu Z., Scannell D.R., Eisen M.B., Tjian R. // *Cell.* 2011. V. 146. № 5. P. 720–731.
178. Pena-Hernandez R., Marques M., Hilmi K., Zhao T., Saad A., Alaoui-Jamali M.A., del Rincon S.V., Ashworth T., Roy A.L., Emerson B.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 7. P. E677–686.
179. Han L., Lee D.H., Szabo P.E. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 3. P. 1124–1135.
180. Kurukuti S., Tiwari V.K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenkova V., Reik W., Ohlsson R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 28. P. 10684–10689.
181. Li T., Hu J.F., Qiu X., Ling J., Chen H., Wang S., Hou A., Vu T.H., Hoffman A.R. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 20. P. 6473–6482.
182. Dekker J., Mirny L. // *Cell.* 2016. V. 164. № 6. P. 1110–1121.
183. Gomez-Diaz E., Corces V.G. // *Trends Cell Biol.* 2014. V. 24. № 11. P. 703–711.

184. Cai H.N., Shen P. // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 493–495.
185. Kuhn E.J., Viering M.M., Rhodes K.M., Geyer P.K. // *EMBO J*. 2003. V. 22. № 10. P. 2463–2471.
186. Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E., Parshikov A., Belenkaya T., Pirrotta V., Georgiev P. // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 495–498.
187. Kyrchanova O., Toshchakov S., Parshikov A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol*. 2007. V. 27. № 8. P. 3035–3043.
188. Kyrchanova O., Toshchakov S., Podstreshnaya Y., Parshikov A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol*. 2008. V. 28. № 12. P. 4188–4195.
189. Comet I., Savitskaya E., Schuettengruber B., Negre N., Lavrov S., Parshikov A., Juge F., Gracheva E., Georgiev P., Cavalli G. // *Dev. Cell*. 2006. V. 11. № 1. P. 117–124.
190. Comet I., Schuettengruber B., Sexton T., Cavalli G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 6. P. 2294–2299.
191. Savitskaya E., Melnikova L., Kostuchenko M., Kravchenko E., Pomerantseva E., Boikova T., Chetverina D., Parshikov A., Zobacheva P., Gracheva E., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2006. V. 26. № 3. P. 754–761.
192. Kravchenko E., Savitskaya E., Kravchuk O., Parshikov A., Georgiev P., Savitsky M. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. № 21. P. 9283–9291.
193. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res*. 2011. V. 39. № 8. P. 3042–3052.
194. Fujioka M., Mistry H., Schedl P., Jaynes J.B. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12(2). P. e1005889.
195. Chen H., Levo M., Barinov L., Fujioka M., Jaynes J.B., Gregor T. // *Nat. Genet*. 2018. V. 50. № 9. P. 1296–1303.
196. Kyrchanova O., Maksimenko O., Ibragimov A., Sokolov V., Postika N., Lukyanova M., Schedl P., Georgiev P. // *Sci. Adv*. 2020. V. 6. № 13. P. eaaz3152.
197. Kaye E.G., Kurbidaeva A., Wolle D., Aoki T., Schedl P., Larschan E. // *Mol. Cell. Biol*. 2017. V. 37. № 21. P. e00253-17.
198. Kyrchanova O., Sabirov M., Mogila V., Kurbidaeva A., Postika N., Maksimenko O., Schedl P., Georgiev P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 27. P. 13462–13467.
199. Krivega M., Savitskaya E., Krivega I., Karakozova M., Parshikov A., Golovnin A., Georgiev P. // *Chromosoma*. 2010. V. 119. № 4. P. 425–434.
200. Sexton T., Cavalli G. // *Cell*. 2015. V. 160. № 6. P. 1049–1059.
201. Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G. // *Cell*. 2012. V. 148. № 3. P. 458–472.
202. Hons M.T., Huis In 't Veld P.J., Kaesler J., Rombaut P., Schleiffer A., Herzog F., Stark H., Peters J.M. // *Nat. Commun*. 2016. V. 7. P. 12523.
203. Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L.A. // *Cell Rep*. 2016. V. 15. № 9. P. 2038–2049.
204. Haarhuis J.H.I., van der Weide R.H., Blomen V.A., Yanez-Cuna J.O., Amendola M., van Ruiten M.S., Krijger P.H.L., Teunissen H., Medema R.H., van Steensel B., et al. // *Cell*. 2017. V. 169. № 4. P. 693–707 e14.
205. Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C., Durand N.C., Huntley M.H., Jewett A.I., Bochkov I.D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 47. P. E6456–6465.
206. Schwarzer W., Abdennur N., Goloborodko A., Pekowska A., Fudenberg G., Loe-Mie Y., Fonseca N.A., Huber W., Haering C.H., Mirny L., et al. // *Nature*. 2017. V. 551. № 7678. P. 51–56.
207. Wutz G., Varnai C., Nagasaka K., Cisneros D.A., Stocsits R.R., Tang W., Schoenfelder S., Jessberger G., Muhar M., Hossain M.J., et al. // *EMBO J*. 2017. V. 36. № 24. P. 3573–3599.
208. Nishiyama T. // *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2019. V. 58. P. 8–14.
209. Rodriguez-Carballo E., Lopez-Delisle L., Zhan Y., Fabre P.J., Beccari L., El-Idrissi I., Huynh T.H.N., Ozadam H., Dekker J., Duboule D. // *Genes Dev*. 2017. V. 31. № 22. P. 2264–2281.
210. Narendra V., Bulajic M., Dekker J., Mazzoni E.O., Reinberg D. // *Genes Dev*. 2016. V. 30. № 24. P. 2657–2662.
211. Hug C.B., Grimaldi A.G., Kruse K., Vaquerizas J.M. // *Cell*. 2017. V. 169. № 2. P. 216–228 e19.
212. Ramirez F., Bhardwaj V., Arrigoni L., Lam K.C., Gruning B.A., Villaveces J., Habermann B., Akhtar A., Manke T. // *Nat. Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 189.
213. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrillov A.A., Flyamer I.M., Kos P., Mikhaleva E.A., Penin A.A., Logacheva M.D., Imakaev M.V., Chertovich A., et al. // *Genome Res*. 2016. V. 26. № 1. P. 70–84.
214. Phillips-Cremins J.E., Corces V.G. // *Mol. Cell*. 2013. V. 50. № 4. P. 461–474.
215. Cattoni D.I., Cardozo Gizzi A.M., Georgieva M., Di Stefano M., Valeri A., Chamousset D., Houbbron C., Dejardin S., Fiche J.B., Gonzalez I., et al. // *Nat. Commun*. 2017. V. 8. № 1. P. 1753.
216. Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandao H.B., Ulianov S.V., Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A., Tachibana-Konwalski K. // *Nature*. 2017. V. 544. № 7648. P. 110–114.
217. Mateo L.J., Murphy S.E., Hafner A., Cinquini I.S., Walker C.A., Boettiger A.N. // *Nature*. 2019. V. 568. № 7750. P. 49–54.
218. Tan L., Xing D., Chang C.H., Li H., Xie X.S. // *Science*. 2018. V. 361. № 6405. P. 924–928.
219. Finn E.H., Pegoraro G., Brandao H.B., Valton A.L., Oomen M.E., Dekker J., Mirny L., Misteli T. // *Cell*. 2019. V. 176. № 6. P. 1502–1515 e10.
220. Luppino J.M., Park D.S., Nguyen S.C., Lan Y., Xu Z., Yunker R., Joyce E.F. // *Nat. Genet*. 2020. V. 52. № 8. P. 840–848.
221. Hansen A.S., Pustova I., Cattoglio C., Tjian R., Darzacq X. // *Elife*. 2017. V. 6. P. e25776.
222. Maeda R.K., Karch F. // *Chromosoma*. 2015. V. 124. № 3. P. 293–307.
223. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., Magbanua J.P., White R., Georgiev P., Schedl P. // *Mech. Dev*. 2015. V. 138. № 2. P. 122–132.
224. Kyrchanova O., Wolle D., Sabirov M., Kurbidaeva A., Aoki T., Maksimenko O., Kyrchanova M., Georgiev P., Schedl P. // *Genetics*. 2019. V. 213. № 3. P. 865–876.
225. Postika N., Metzler M., Affolter M., Muller M., Schedl P., Georgiev P., Kyrchanova O. // *PLoS Genet*. 2018. V. 14. № 12. P. e1007702.
226. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., Deshpande G., Parshikov A., Cleard F., Karch F., Schedl P., Georgiev P. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12. № 7. P. e1006188.
227. Rao S.S.P., Huang S.C., Glenn St Hilaire B., Engreitz J.M., Perez E.M., Kieffer-Kwon K.R., Sanborn A.L., Johnstone S.E., Bascom G.D., Bochkov I.D., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 2. P. 305–320 e24.
228. Li M., Ma Z., Roy S., Patel S.K., Lane D.C., Duffy C.R., Cai H.N. // *Sci. Rep*. 2018. V. 8. № 1. P. 15158.
229. Yokoshi M., Segawa K., Fukaya T. // *Mol. Cell*. 2020. V. 78. № 2. P. 224–235 e5.
230. Stadler M.R., Haines J.E., Eisen M.B. // *Elife*. 2017. V. 6. P. e29550.
231. Despang A., Schopflin R., Franke M., Ali S., Jerkovic I., Paliou C., Chan W.L., Timmermann B., Wittler L., Vingron M., et al. // *Nat. Genet*. 2019. V. 51. № 8. P. 1263–1271.
232. Ghavi-Helm Y., Jankowski A., Meiers S., Viales R.R., Korbel J.O., Furlong E.E.M. // *Nat. Genet*. 2019. V. 51. № 8. P. 1272–1282.

УДК 576.315.42

# Модификация ядерных компартментов и 3D генома в условиях вирусной инфекции

С. В. Разин\*, А. А. Гаврилов, О. В. Яровая

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

\*E-mail: sergey.v.razin@usa.net

Поступила в редакцию 04.06.2020

Принята к печати 07.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11041

**РЕФЕРАТ** В обзоре обсуждается, как изменяется структурно-функциональная компартиментализация клеточного ядра и 3D-организация клеточного генома при заражении клеток различными вирусами. Особое внимание уделено тому, как вносимые изменения способствуют реализации стратегии вируса по преодолению систем противовирусной защиты и обеспечению условий для репликации вируса. Обсуждение фокусируется на вирусах, репликация которых происходит в клеточном ядре. Цитоплазматические вирусы упоминаются в тех случаях, когда в процессе инфекции происходит существенная реорганизация ядерных компартментов либо 3D генома.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** компартиментализация ядра, пространственная организация генома, вирусная инфекция.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнения, что структурно-функциональная компартиментализация клеточного ядра играет важную роль в работе генетического аппарата. При этом сам геном является структурной платформой для компартиментализации ядра [1]. Индивидуальные хромосомы занимают ограниченные области внутри ядра, которые называют хромосомными территориями [2–4]. Будучи относительно изолированными, хромосомные территории тем не менее формируют многочисленные межхромосомные контакты. Кроме того, они прикрепляются к ядерной ламине и ядрышку, организуясь, в конечном итоге, в единый хроматиновый домен. Этот домен пронизывают интерхроматиновые каналы, которые в совокупности составляют интерхроматиновый компартмент [2–6]. Внутри этого компартмента располагаются различные функциональные центры, такие, как ядрышко, тельца Кахаля, РМЛ-тельца, спеклы, транскрипционные фабрики [1, 5, 6]. Расположение в интерхроматиновом компартменте не означает, что в перечисленных функциональных центрах, многие из которых называют также ядерными тельцами, отсутствует ДНК. Ясно, что ДНК присутствует в транскрипционных фабриках, которые располагаются в так называемом перихроматиновом слое, выстилающем интерхроматиновые каналы [5, 6]. Ядрышко представляет собой частный случай транскрипционной фабрики, которая формируется вокруг

кластеров рибосомных генов [7]. Спеклы и тельца Кахаля – это реакционные центры, в которых осуществляются посттранскрипционные преобразования РНК и сосредоточены необходимые для этого ферменты [8–10]. ДНК не является составной частью этих функциональных компартментов, однако существуют многочисленные свидетельства того, что гены могут привлекаться к ним по ходу осуществления процессинга различных типов РНК [11–13].

К высшим уровням пространственной организации генома в клеточном ядре можно отнести: (i) пространственную сегрегацию активного (А) и неактивного (В) компартментов генома [14], (ii) разделение хромосом на частично инсулированные топологически-ассоциированные домены (ТАДы) [15–17], которые во многих случаях ограничивают сферу действия энхансеров [18–20], и (iii) установление пространственных контактов между удаленными геномными элементами посредством выпетливания разделяющих их сегментов хроматиновой фибриллы [21]. Функциональное значение таких пространственных контактов может быть различным. В клетках млекопитающих контакты между конвергентными сайтами связывания инсуляторного белка CTCF ограничивают ТАДы [22]. Пространственные контакты между энхансерами и промоторами (энхансер-промоторные петли) обеспечивают установление коммуникации между этими регуляторными элементами [23]. Изменения пространственной организации генома,

происходящие в том числе в результате хромосомных перестроек и утраты сайтов связывания СТСФ, приводят к изменению профилей транскрипции и в ряде случаев являются причиной возникновения онкологических и иных заболеваний [18, 24–28].

Как уже говорилось выше, упакованный геном представляет собой своего рода платформу для структурно-функциональной компартиментализации клеточного ядра. Однако справедливо и обратное утверждение. Взаимодействие определенных частей генома с функциональными ядерными компартаментами поддерживает 3D-организацию генома. Так, пространственная сегрегация А- и В-компарментов генома обеспечивается привлечением активных генов к спеклам и репрессированных генов – к ядрышку и ядерной ламине [13, 29–31]. Привлечение различных генов к тельцам Кахала и общим транскрипционным фабрикам способствует установлению пространственных контактов между удаленными участками генома, в том числе и между разными хромосомами [11, 32–36].

Размножающиеся в клеточном ядре вирусы используют клеточные системы в ходе инфекционного процесса. Хотя особенности инфекционного процесса существенно различаются для разных вирусов, а также в зависимости от типа инфекции (литическая или латентная), представляется очевидным, что вирусы должны адаптировать функциональную компартиментализацию ядра под свои нужды. Несмотря на то что процесс взаимодействия вируса с клеткой-хозяином изучается в течение десятилетий, этот аспект проблемы пока не получил внимания исследователей, адекватного его значению. В этом обзоре мы попытаемся суммировать современные сведения о том, как вирусы модифицируют ядерные компартамента и 3D-организацию клеточного генома. Хотя наше обсуждение главным образом будет фокусироваться на вирусах, репликация которых происходит в клеточном ядре, в ряде случаев будут упоминаться и цитоплазматические вирусы, инфекция клеток которыми по тем или иным причинам приводит к реорганизации ядерных компарментов либо 3D генома.

## 2. РЕОРГАНИЗАЦИЯ И ПЕРЕПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРЕДСУЩЕСТВУЮЩИХ ЯДЕРНЫХ КОМПАРТМЕНТОВ ПРИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

При вирусной инфекции модифицируются многие ядерные компартамента (рис. 1). Эти модификации обусловлены необходимостью подавления противовирусной защиты клетки либо использования для репликации вируса сосредоточенных в компартаментах ферментов. Вирусы контролируют процесс реорганизации ядерных компарментов посредством проникновения в эти компартамента либо направления

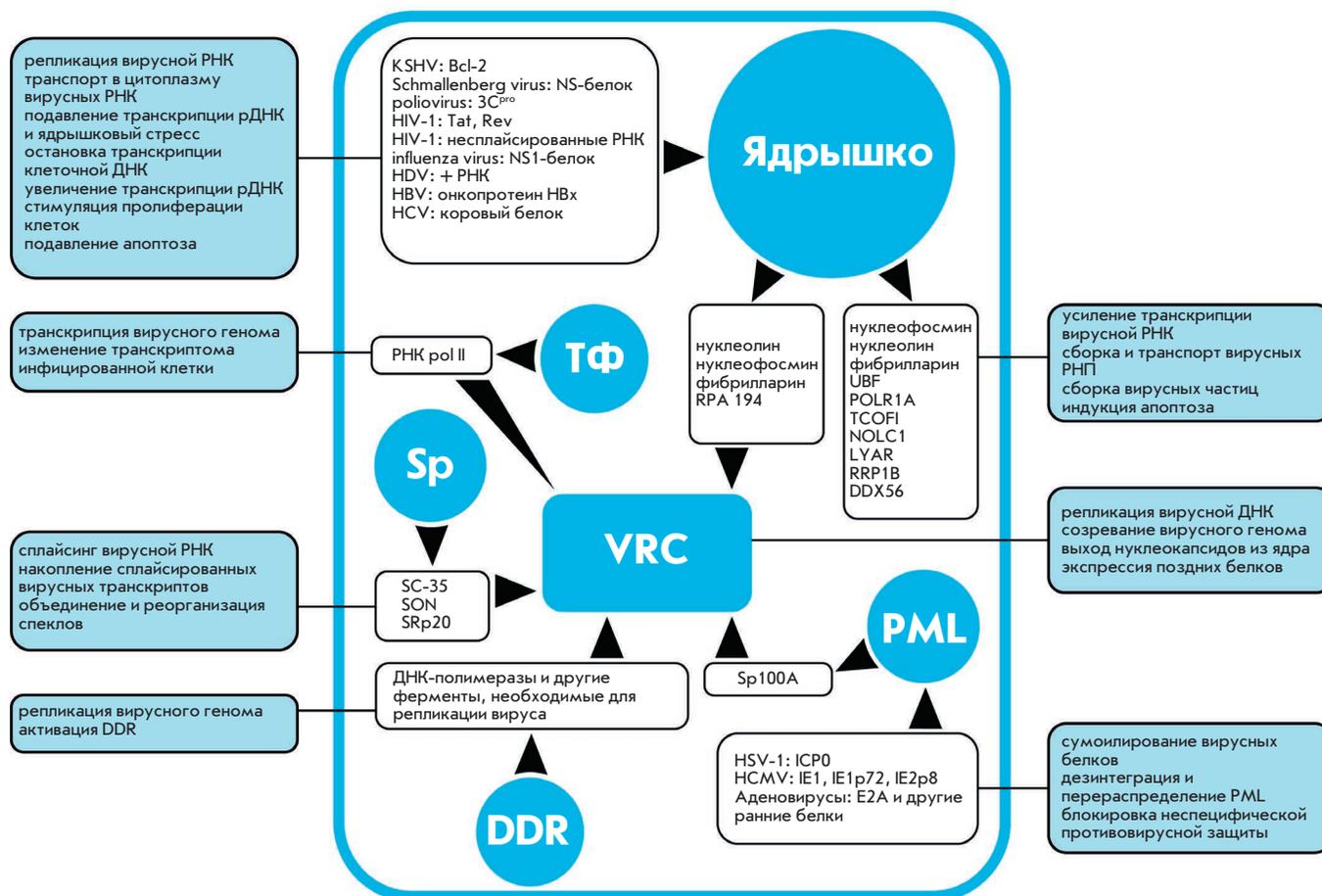
туда кодируемых вирусным геномом белков (рис. 1). Наиболее хорошо изучен процесс взаимодействия вирусов с ядрышком и РМЛ-тельцами, хотя вирусы взаимодействуют и с другими ядерными компартаментами. Наряду с этим в ядрах собираются новые компартамента, в которых происходит репликация вирусов. Ниже все эти процессы рассматриваются более подробно.

### 2.1. Ядрышко

Ядрышко – самый узнаваемый функциональный компартамент клеточного ядра. Основной функцией ядрышка является биогенез рибосом. Однако ядрышко выполняет и целый ряд иных, так называемых «неканонических» функций, будучи местом секвестрирования различных белков и участвуя в регуляции клеточного цикла, ответе на стрессы, организации неактивного компартамента генома и ряде других функциональных процессов [37]. В этой связи не удивительно, что в ходе инфекции вирусы тесно взаимодействуют с ядрышком. Это касается как вирусов, репликация которых происходит в клеточном ядре, так и вирусов, реплицирующихся в цитоплазме. Результатом взаимодействия, опосредованного направлением в ядрышко различных вирусных белков, может быть полная или частичная дезинтеграция ядрышка, релокализация ядрышковых белков в нуклеоплазму и цитоплазму и релокализация нуклеоплазменных белков в ядрышко [38–42].

Уже в самых ранних работах показано, что от взаимодействий вируса с ядрышком прямо зависит эффективность инфекционного процесса [43–45]. С развитием протеомики появились более полные данные о спектре взаимодействующих вирусных и ядрышковых белков [41, 46–49]. Эксперименты по сравнению протеома ядрышек, выделенных из здоровых и инфицированных аденовирусом клеток, позволяют заключить, что перемещение из ядрышка и в ядрышко затрагивает очень широкий круг белков [39–41, 50, 51]. В вирусные репликативные центры (см. раздел 3), нуклеоплазму и цитоплазму релокализируются типичные ядрышковые белки; одновременно в ядрышко перемещаются как вирусные белки, так и целый ряд клеточных белков, однако последствия этого перемещения не всегда понятны. Взаимодействия вирусов с ядрышком складываются в результате наложения двух диаметрально противоположных процессов: (1) антивирусной стратегии клетки и (2) стратегии вируса, направленной на преодоление антивирусного ответа и максимальное использование в своих целях имеющихся клеточных ресурсов.

Наиболее полно охарактеризована роль нуклеолина в противовирусной защите, однако остается неясным, коррелирует ли выход нуклеолина из ядрышка



**Рис. 1.** Схема перемещения клеточных и вирусных белков/нуклеиновых кислот между компартментами ядра в ходе инфекционного процесса. Синие кружки – ядерные компартменты: ТФ – транскрипционные фабрики, Sp – спеклы, PML – ядерные тельца промиелоцитарной лейкемии, DDR – фокусы репарации ДНК, VRC – вирусные репликативные центры. В рамках внутри ядра: вирусные и клеточные белки и нуклеиновые кислоты, перемещающиеся в ходе инфекционного процесса. Направления перемещения обозначены черными стрелками. В рамках на полях: последствия для клеточного и вирусного метаболизма, ассоциированные с перемещением белков/нуклеиновых кислот в/из соответствующего компартмента в ходе инфекционного процесса

с реализацией его антивирусных свойств. Более того, помимо ядерного нуклеолина (преимущественно сосредоточенного в ядрышке) в клетке присутствует цитоплазматический нуклеолин и нуклеолин, связанный с внешней мембраной [52, 53]. В ряде случаев остается неясным, какой именно пул нуклеолина используется в противовирусной защите. При инфекции клеток высокопатогенным штаммом вируса гриппа H5N1 подавление экспрессии нуклеолина существенно увеличивает активность вирусной полимеразы, повышает уровень синтеза вирусной мРНК, усиливает апоптоз и некроз клетки-хозяина. Напротив, сверхэкспрессия нуклеолина уменьшает интенсивность инфекционного процесса [54]. Противовирусная активность нуклеолина продемонстрирована и при инфицировании вирусом чумы коз (PPRV). Эта активность связана с индукцией интер-

феронового ответа клетки-хозяина [55]. Связывание нуклеолина с G-квадруплексами в составе вирусных РНК [56] и ДНК [57] подавляет работу вирусов, в том числе посредством блокирования промоторов [57].

Индукция апоптоза инфицированных клеток рассматривается как один из путей защиты организма от инфекции. В этом контексте стоит упомянуть, что элементом противовирусной защиты организма является секвестрирование в ядрышке вирусных антиапоптотических факторов и освобождение из ядрышка клеточных проапоптотических факторов. Так, белок PICT-1, связываясь с супрессором апоптоза KS-Bcl-2 герпесвируса человека KSHV (вирус саркомы Капоши), подавляет его антиапоптотическую активность, секвестрируя KS-Bcl-2 в ядрышке [58].

Конкретные механизмы индукции нуклеолярного стресса и апоптоза при проникновении вируса в клет-

ку, а также возможности перепрофилирования этих процессов для реализации стратегии размножения вируса не всегда понятны. Можно упомянуть множество работ, демонстрирующих комплексный характер взаимодействия вирусных белков с компонентами ядрышка. Так, белок NS вируса Шмалленберг разрушает ядрышко, вызывая перемещение нуклеофосмина из ядрышка в нуклеоплазму [59]. Протеаза полиовируса 3C<sup>pro</sup>, локализуясь в ядрышке, модифицирует участвующие в транскрипции рДНК UBF и SL1, расщепляет транскрипционный фактор TAF 110 и таким образом ингибирует синтез рибосомной РНК (рРНК) [60]. Предшественники протеазы 3C<sup>pro</sup> риновируса 16 человека локализируются в ядрышке с нуклеофосмином, что сопровождается расщеплением транскрипционного фактора OCT-1 и полной остановкой транскрипции клеточной ДНК [61]. Белок Tat вируса иммунодефицита человека, взаимодействуя с фибрилларинном и U3 малой ядрышковой РНК (snoRNA), нарушает процесс созревания рРНК [62]. Белок NS1 вируса гриппа H3N2 взаимодействует с NOLC1, который регулирует транскрипцию рДНК, связываясь с большой субъединицей РНК-полимеразы. Взаимодействие понижает уровень NOLC1, вызывая апоптоз [63]. Связывание этого же белка с нуклеолином вызывает гиперметилирование UCE (upstream control element) генов рРНК, остановку синтеза рРНК и следующий за этим нуклеоллярный стресс [64]. При заражении клеток другими вирусами и другом развитии инфекционного процесса (латентная инфекция) можно наблюдать и прямо противоположный процесс, а именно активацию транскрипции генов рРНК. Коровый белок вируса гепатита С, связываясь с нуклеофосмином, перемещается в ядрышко, где взаимодействует с UBF и РНК-полимеразой I. В результате усиливается связывание этих факторов с промотором генов рРНК и возрастает уровень их транскрипции. Ядрышко увеличивается в размерах и перемещается на периферию ядра [65]. Аналогичным образом действует онкобелок NBx вируса гепатита В. NBx транспортируется в ядрышко нуклеофосмином и ацетилюет нуклеофосмин, что вызывает высвобождение гистонов из состава хроматина промотора генов рРНК. Это, в свою очередь, увеличивает транскрипционную активность ядрышка и пролиферативную активность клетки [66]. В координации с другими механизмами контроля пролиферации [67] хроническая инфекция ведет к трансформации клеток. Значение всех этих наблюдений в контексте инфекционной стратегии вируса и механизмов антивирусной защиты еще предстоит объяснить.

Наряду с уклонением от действия систем противовирусной защиты, вирусы активно используют

в своих целях секвестрированные в ядрышке белки, а в ряде случаев и ядрышко в целом как частично изолированный от нуклеоплазмы компартмент. В ходе инфекционного процесса белки ядрышка могут прямо использоваться для процессов репликации и транскрипции вирусных нуклеиновых кислот и сборки вирусных частиц. РНК-содержащие вирусы, геном которых представлен минус цепью РНК (вирус гриппа, тогатовирус, вирус болезни Борна), реплицируют геномную РНК в ядре и тесно взаимодействуют с ядрышком. В ранних работах было показано, что вирус болезни Борна использует именно ядрышко в качестве места для репликации [68]. Смысловая цепь РНК вируса гепатита дельта транскрибируется в ядрышке, в то время как цепь РНК противоположной полярности синтезируется в нуклеоплазме [69]. Такая сегрегация позволяет вирусу максимально эффективно использовать транскрипционный аппарат и компартментализацию ядра клетки-хозяина. При инфекции вирусом иммунодефицита человека (HIV-1) ядрышко является местом сборки комплексов, обеспечивающих транспорт в цитоплазму несплайсированных и частично сплайсированных вирусных РНК. Несплайсированная РНК HIV-1 используется в качестве мРНК для синтеза белков Gag и Gag-Pol, а также в качестве геномной РНК. Не полностью сплайсированные РНК используются как мРНК для синтеза белков Vif, Vpr, Tat, Vpr и Env, в то время как полностью сплайсированные РНК используются как мРНК для синтеза белков Vpr, Tat, Rev и Nef. Несплайсированная и не полностью сплайсированные РНК HIV-1 нестабильны и быстро разрушаются в ядре. Для защиты этих РНК от разрушения и их транспорта в цитоплазму необходим белок Rev, причем образование сложного транспортного комплекса происходит в ядрышке, куда релокализуется несплайсированная и частично сплайсированная РНК HIV-1. Синтезированный в цитоплазме с использованием в качестве матрицы сплайсированной РНК белок Rev содержит сигнал локализации в ядре и сигнал локализации в ядрышке. После транспорта в ядро образуется комплекс Rev с нуклеопоринами Nup98 и Nup214 и экспортином CRM1, и этот комплекс транспортируется в ядрышко [70–72], где происходит мультимеризация Rev и его связывание со специфическими последовательностями RRE в составе вирусной РНК [73]. Таким образом, в ходе инфекционного процесса вирус использует как белки клетки-хозяина, так и ядрышко как «перевалочный пункт» и платформу для сборки вирусных РНК-частиц.

Однако более распространенным феноменом является индуцируемая вирусом релокализация ядрышковых белков в нуклеоплазму с последующим их использованием для репликации вируса. В составе

вирусных репликативных компартментов (см. раздел 3 и рис. 1) обнаружены многочисленные белки ядрышка: нуклеофосмин, нуклеолин, фибрилларин, UBF, Nopp140, POLR1A, TCOFI, NOLC1 [74–76]. В клетках, инфицированных герпесвирусами (HSV-1 и HCMV), структура и белковый состав ядрышка существенным образом видоизменяются [38]. Три основных белка ядрышка – нуклеолин, нуклеофосмин и фибрилларин, а также RPA 194, перемещаются в репликативные компартменты вируса, где принимают участие в репликации, транскрипции и сборке вирусных частиц. В целом ряде работ показано, что нуклеолин необходим для формирования репликативных компартментов различных герпесвирусов [38, 42]. В комплексе с вирусной нуклеазой UL12 нуклеолин обеспечивает созревание вирусного генома и выход нуклеокапсидов из ядра [77, 78]. В ходе цитомегаловирусной инфекции ассоциация нуклеолина с компонентом вирусной ДНК-полимеразы UL44 необходима для эффективной репликации ДНК и экспрессии поздних белков [79].

В ходе заражения вирусом гриппа концентрация многофункционального вирусного белка NS1 в ядрышке сопровождается вытеснением нуклеолина на периферию ядра и перераспределением фибрилларина [80]. Предполагается, что нуклеолин обеспечивает транспорт рибонуклеопротеиновых комплексов и участвует в репликации вирусной РНК. Ядрышковый белок RRP1B, участвующий в биогенезе рибосом, релокализуется из ядрышка в нуклеоплазму, где ассоциируется с РНК-зависимой РНК-полимеразой, усиливая транскрипцию вирусной РНК [81]. Один из многофункциональных белков ядрышка LYAR, перемещаясь из ядрышка в нуклеоплазму и цитоплазму, облегчает сборку рибонуклеопротеиновых комплексов вируса гриппа А [82].

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что вирусы могут напрямую воздействовать на аппарат транскрипции рибосомных генов или модифицировать белковый состав ядрышек, а также использовать ядрышко в качестве безопасного места биогенеза новых вирусных частиц. В результате в ходе вирусной инфекции может нарушаться гомеостаз ядрышка, изменяться его морфология и компартиментализация, что, в свою очередь, может использоваться для реализации максимально эффективных стратегий выживания и размножения патогена.

## 2.2. Фокусы репарации

Фокусы репарации (DDR-фокусы, DNA damage response) используются многими вирусами в качестве источника ферментов, необходимых для репликации вируса. К числу таких вирусов относятся различные парвовирусы, в частности MVM. Показано, что, про-

никая в клеточное ядро, ДНК MVM предпочтительно локализуется рядом с поврежденными участками клеточного генома, которые ассоциированы с фосфорилированным гистоном H2AX и факторами репарации [83, 84]. Рядом с фокусами DDR формируются вирусные репликативные центры, в которые привлекаются присутствующие в фокусах DDR ДНК-полимеразы и другие ферменты, необходимые для репликации вируса. По ходу развития инфекционного процесса предсуществующих фокусов DDR оказывается недостаточно для сборки новых вирусных репликативных центров, и вирус стимулирует внесение новых повреждений ДНК, в результате чего число доступных для вируса фокусов репарации ДНК существенно возрастает [84, 85]. Аналогичный механизм, по-видимому, используют и другие парвовирусы [86–88]. Активация DDR характерна и для инфицирования клеток вирусами ряда других групп [89, 90]. Прямо показано, что после проникновения в клетку вирус папилломы человека локализуется рядом с нестабильными участками хромосом (fragile sites) [91].

## 2.3. Транскрипционные фабрики, спеклы и параспеклы

Транскрипция генов ДНК-содержащих вирусов осуществляется клеточной РНК-полимеразой II, значительная часть молекул которой секвестрирована в транскрипционных фабриках [11, 32, 35, 36, 92–94]. Что представляют собой транскрипционные фабрики остается не вполне ясным. Согласно ряду данных, стабильные кластеры РНК-полимераз существуют вне зависимости от активной транскрипции. Другая точка зрения состоит в том, что в кластеры собираются инициированные транскрипционные комплексы (для обзора см. [35]). При всех условиях ясно, что транскрипционные фабрики ассоциированы с активным компартментом генома. Именно с этим компартментом генома предпочтительно контактирует большинство попадающих в клеточное ядро вирусов. На последующих этапах инфекции происходит сборка вирусных репликативных центров (см. раздел 3). Не вполне ясно, захватывают эти центры предсуществующие транскрипционные фабрики или происходит релокализация в них свободной РНК-полимеразы по мере дезинтеграции клеточных транскрипционных фабрик. В конечном счете значительная часть предсуществующих транскрипционных фабрик утрачивается, а РНК-полимераза II сосредотачивается в вирусных центрах репликации/транскрипции [95–98].

Так называемые «спеклы» представляют собой компартменты, в которых сосредоточен аппарат сплайсинга [8, 9]. При этом информация о том, являются ли эти компартменты просто местом хранения

факторов сплайсинга, которые по мере необходимости привлекаются к местам транскрипции, либо сплайсинг может осуществляться непосредственно в спеклах, остается противоречивой [99, 100]. Вирусная инфекция приводит к реорганизации спеклов [101–103]. Для ранних стадий литической инфекции характерно перераспределение факторов сплайсинга (SC-35, SON, SRp20 и др.) к центрам вирусной репликации/транскрипции [102–105] (см. раздел 3 и *рис. 1*). На поздних стадиях литической инфекции происходит объединение спеклов в более крупные компартменты, в которых обнаруживаются сплайсированные вирусные транскрипты [106, 107]. Само по себе слияние спеклов в более крупные компартменты типично для клеточного ответа на различные стрессы, к числу которых можно отнести и вирусную инфекцию [108, 109]. То обстоятельство, что на поздних стадиях инфекции в спеклах накапливаются сплайсированные транскрипты, позволяет предположить, что накопление таких транскриптов в спеклах является одним из этапов их транспорта в цитоплазму [106]. Совершенно иная ситуация наблюдается при инфекции перmissive клеток вирусом гриппа. В этом случае сплайсинг одной из вирусных РНК происходит именно в спеклах [110].

Во многих клетках рядом со спеклами локализуются небольшие компартменты, сформированные на платформе некодирующей РНК NEAT1. Эти компартменты получили название «параспеклы» [111]. Функции параспеклов не до конца ясны. Среди этих функций можно упомянуть секвестрирование редактированной РНК аденозиндезаминазы и ответ на стресс [111–113]. При инфекции клеток различными вирусами уровень NEAT1 РНК и количество параспеклов заметно увеличиваются [114–117]. По-видимому, это связано с активацией механизма врожденного иммунитета, потому что NEAT1 РНК связывает репрессор, подавляющий транскрипцию генов ряда цитокинов, в том числе интерлейкина 8 [114, 118]. В то же время в одной из опубликованных работ сообщалось о том, что вирус простого герпеса (HSV-1) использует для своей репликации секвестрированные в параспеклах белки [117]. В этой работе показано, что при литической инфекции геном HSV-1 локализуется в параспеклах и что подавление экспрессии NEAT1 приводит к снижению продукции вирусных частиц.

#### 2.4. PML-тельца

Давно известно, что на начальных стадиях вирусной инфекции вирусспецифичные белки направляются в PML-тельца и стимулируют их дезинтеграцию [119–123]. В PML-тельцах сосредоточено много различных белков, среди которых наиболее характер-

ными компонентами являются PML, hDaxx, ATRX и Sp100. Все эти белки играют важную роль в системе неспецифического противовирусного иммунитета [124–127], которую вирус должен инактивировать. Разные вирусы решают эту задачу по-разному. Так, направляемый в PML-тельца белок ICP0 HSV-1 это убиквитин-лигаза, избирательно убиквитирующая сумоилированные белки, в том числе PML и Sp100, что стимулирует их деградацию протеасомной системой [128, 129]. Ранний белок IE1 цитомегаловируса, напротив, подавляет сумоилирование PML, которое критически необходимо для формирования PML-тельца [130]. В обоих случаях конечный результат состоит в дезинтеграции PML-тельца. Ранние белки аденовирусов также направляются в PML-тельца и вызывают деградацию DAXX и перераспределение PML [131–133]. Разрушение PML-тельца происходит и при литической инфекции клеток другими ДНК-содержащими вирусами [134].

Стоит отметить, что после проникновения в ядро геномы многих вирусов локализуются рядом с PML-тельцами [135, 136]. Причины этого не вполне ясны. Не ясно также, происходит ли перемещение вирусных геномов к предсуществующим PML-тельцам либо PML-тельца формируются *de novo* рядом с вирусными геномами [137, 138]. В последнем случае сборка PML-тельца рядом с вирусными геномами может быть одним из этапов работы механизма противовирусной защиты. Ситуация может быть и более сложной. Вирус может нуждаться в ряде белков, секвестрированных в PML-тельцах, в том числе и в аппарате убиквитинирования. Недавно показали, что ДНК-связывающий белок аденовируса E2A сумоилируется ферментным аппаратом хозяйской клетки и привлекает в вирусные репликативные центры транскрипционный фактор Sp100A, освобождающийся из PML-тельца после индуцированного другим вирусным белком (E4orf3) перераспределения PML из тельца в трэки [139]. Показано также, что белки IE1p72 и IE2p86 цитомегаловируса человека транзитно локализуются в PML-тельцах, где они сумоилируются [140].

### 3. СБОРКА НОВЫХ КОМПАРТМЕНТОВ – ВИРУСНЫЕ РЕПЛИКАТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ

Характерная особенность литической инфекции ДНК-содержащими вирусами – появление в ядрах клеток нового типа функциональных компартментов – вирусных репликативных центров (viral replication compartment, VRC). Такие центры собираются вокруг проникших в клеточное ядро индивидуальных вирусных геномов и служат местами репликации и транскрипции вирусной ДНК [74, 141]. На поздних стадиях инфекции каждый VRC со-

держит много копий вирусной ДНК, причем все они представляют собой реплики исходной молекулы вирусной ДНК, вокруг которой был собран VRC [142–144]. При этом зоны активной репликации и транскрипции внутри VRC могут быть пространственно сегрегированы [145]. Белковый состав VRC достаточно сложный, он включает как вирусспецифичные, так и клеточные компоненты [74, 141]. К последним относятся прежде всего ферменты репликации ДНК, РНК-полимераза II и компоненты аппарата транскрипции, широкий круг репаративных ферментов, факторы ремоделирования хроматина [49, 146, 147].

Интересным представляется вопрос о том, что обеспечивает поддержание структуры VRC. В последние годы появилось много свидетельств того, что в процессе сборки ядерных функциональных компартментов важную роль играет процесс разделения жидких фаз [148]. При этом выделение того или иного компартмента в отдельную фазу обеспечивается множественными взаимодействиями неструктурированных белковых доменов (intrinsically disordered regions, IDR), присутствующих в этом компартменте [149]. В этой связи заслуживает упоминание тот факт, что IDR присутствуют в составе многих вирусспецифичных белков, в том числе ранних белков, которые играют ключевую роль в перепрофилировании клеточного метаболизма, дезинтеграции PML-телец и сборке VRC [150–153]. К особенностям IDR относится их способность взаимодействовать с большим количеством различных партнеров, обеспечивая таким образом платформу для сборки функциональных компартментов [151]. VRC могут объединяться друг с другом [107, 154], что типично для жидких конденсатов. В то же время в недавно опубликованной работе показано, что VRC вируса простого герпеса не разрушаются 1,6-гександиолом (агент, нарушающий разделение фаз), и кинетика обмена РНК-полимеразой II между VRC и нуклеоплазмой не соответствует ожидаемой для жидких конденсатов [155]. Авторы предполагают, что платформой для привлечения РНК-полимеразы II и ряда других ДНК-связывающих белков в VRC служит свободная от нуклеосом вирусная ДНК, и что VRC не являются типичными жидкими конденсатами, хотя процесс разделения жидких фаз может играть определенную роль на этапе их формирования [155].

По крайней мере для герпесвирусной инфекции показано, что VRC могут перемещаться внутри клеточного ядра, и на поздних стадиях инфекции возможно их слияние, обеспечивающее возможность рекомбинации между вирусными геномами, реплицированными в разных VRC [144]. Перемещение VRC внутри ядра является активным процессом, так как оно подавляется ингибиторами актина и миозина. В результа-

те направленного перемещения VRC приближаются к спеклам, что, по-видимому, способствует осуществлению сплайсинга вирусных транскриптов [107]. Показано также, что при литической инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, белки SC-35, SON, SRp20 и ряд других компонентов аппарата сплайсинга релокализируются из спеклов в особые структуры на поверхности VRC [104]. Таким образом, стратегии организации сплайсинга вирусных транскриптов могут различаться у разных герпесвирусов.

#### **4. МОДИФИКАЦИЯ 3D ГЕНОМА В УСЛОВИЯХ ЛИТИЧЕСКОЙ И ЛАТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРИ ИНТЕГРАЦИИ ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ**

##### **4.1. Литическая инфекция: ассоциация вирусов предпочтительно с А-компаратментом генома и увеличение А-компаратмента на поздних стадиях инфекции**

В последние годы опубликовано несколько работ, посвященных изучению возможности существования в геноме хозяйских клеток областей, с которыми вирусный геном предпочтительно контактирует на различных стадиях литической инфекции. Во всех этих работах использованы методы, основанные на лигировании близкорасположенных фрагментов ДНК в фиксированных ядрах (так называемые C-методы [156, 157]). С использованием экспериментальных протоколов, позволяющих отследить весь спектр контактов вирусного генома с геномом клетки-хозяина, показано, что при литической инфекции вирусы предпочтительно контактируют с активным (А) компартментом генома [158, 159]. В рамках А-компаратмента аденовирусы предпочтительно контактируют с любыми промоторами и энхансерами [159], а вирус гепатита В – с CpG-островками [158]. На примере вируса Эпштейна–Барр показано, что один и тот же вирус предпочтительно контактирует с неактивным хроматином при латентной инфекции [160, 161] и перемещается в активный хроматиновый компартмент после индукции репликации вируса [161]. Ассоциация с активным хроматином характерна и для РНК-содержащего вируса гриппа, репликация генома которого происходит в клеточном ядре [162]. По ходу литической инфекции этим вирусом и аденовирусами стимулируется расширение А-компаратмента. В случае вируса гриппа раскрыт механизм этого феномена. Вирусспецифичный белок NS1 препятствует терминции транскрипции клеточных генов на сайтах полиаденилирования. Следствием этого является продолжение транскрипции на значительные (иногда более 100 т.п.н.) расстояния за пределами гена. Авторы показали, что движущаяся РНК-полимераза способствует удалению

когезина с сайтов связывания CTCF, что приводит к утрате хроматиновых петель и существенному изменению конфигурации генома. Кроме того, ассоциированные с транскрибирующей РНК-полимеразой ферменты могут способствовать ремоделированию хроматина, снимая репрессивные метки [162]. Преимущества, которые получает вирус от расширения А-компартамента, еще предстоит выяснить. Массированное подавление терминации транскрипции на концах клеточных генов происходит и при литической инфекции, вызванной вирусом простого герпеса [163, 164]. При этом происходит экспансия активного хроматина в ранее неактивные области. О том, насколько значительно расширение активного хроматинового компартамента при герпесвирусной инфекции судить пока сложно, поскольку в этом случае влияние инфекции на компартаментализацию генома не было изучено с использованием метода Hi-C.

#### 4.2. Модификация 3D генома хозяйской клетки при латентной инфекции, направляемая вирусными транскрипционными факторами

Как уже говорилось выше, вирус Эпштейна–Барр может как инфицировать клетки литически, так и поддерживаться в клетках в латентной форме в виде ассоциированной с хроматином кольцевой эписомы. Выделяют несколько типов латентной инфекции, различающихся по спектрам экспрессируемых вирусных белков [165]. Латентная инфекция вирусом Эпштейна–Барр ассоциирована с возникновением различных онкологических заболеваний [166, 167], в силу чего механизмы эпигенетического репрограммирования клеток вирусспецифичными белками и микроРНК являются предметом интенсивного изучения. Показано, что вирусспецифичный белок EBNA2 связывается с энхансерами и модулирует экспрессию клеточных генов посредством реконфигурации пространственной организации генома [168] (рис. 2А). При этом EBNA2 активирует транскрипцию ряда генов, в том числе *c-myc*, стимулируя возникновение новых энхансер-промоторных петель [168, 169]. Активация транскрипции *c-myc* приводит к трансформации клеток, приобретающих способность к неограниченной пролиферации. EBNA3A–С инициируют репрессию определенной группы генов, в том числе проапоптотических. Эти вирусспецифичные белки также связываются предпочтительно с энхансерными элементами [169, 170]. В ряде ситуаций они препятствуют установлению энхансер-промоторных контактов (разрушают энхансер-промоторные петли) (рис. 2А). В других случаях EBNA3A–С инициируют сборку репрессорных «хабов». Эти репрессорные «хабы» формируются посредством привлечения репрессорных комплексов Polycomb [169, 171].

Транскрипционный регулятор Tat вируса HIV-1 обладает способностью проникать в любые клетки благодаря домену клеточного проникновения (CPD) [172]. Tat секретируется в кровь Т-лимфоцитами, зараженными HIV-1 и, попадая в В-клетки человека, изменяет взаиморасположение генов в ядре [173].

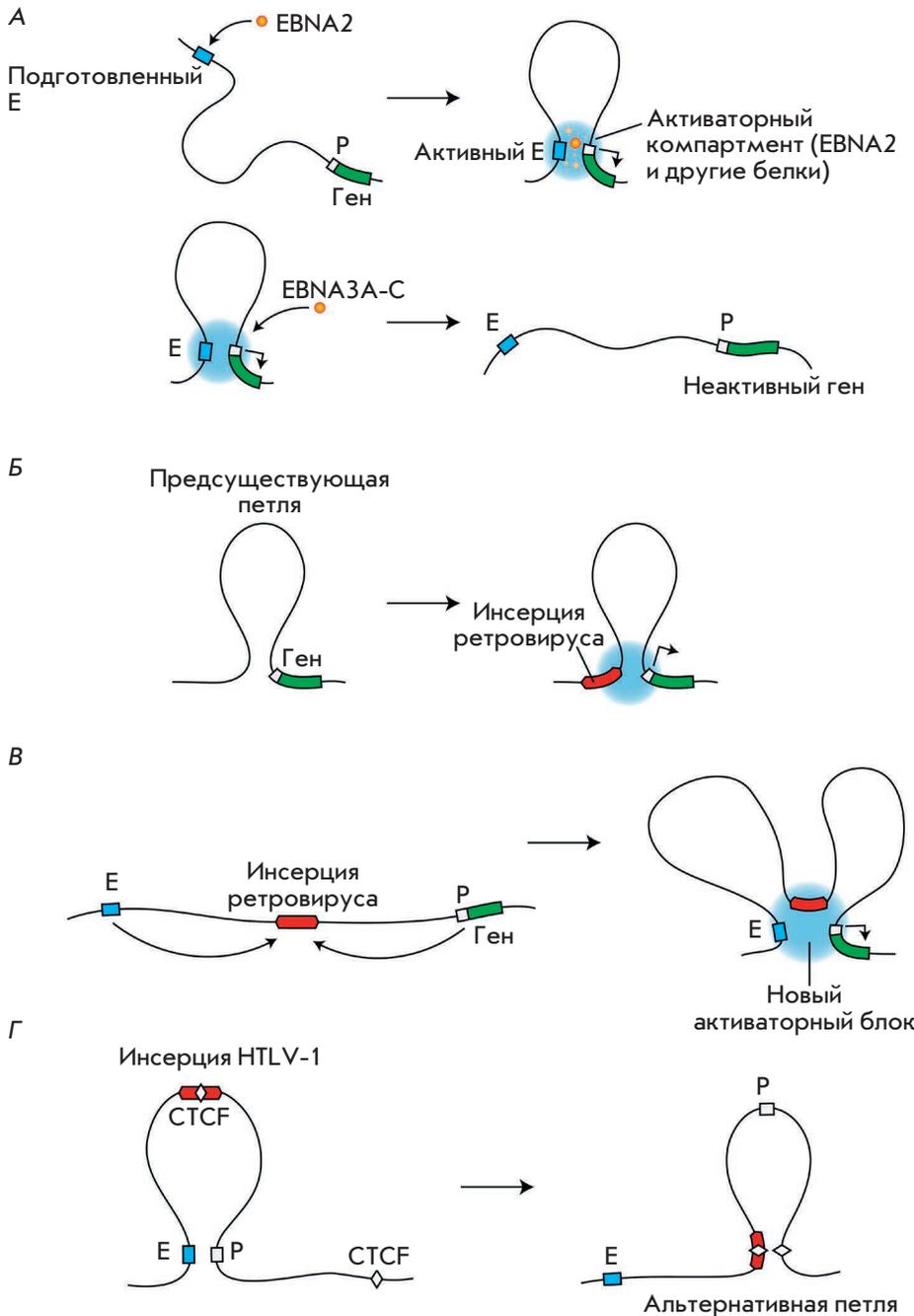
В настоящее время трудно сказать, насколько распространены механизмы реорганизации 3D генома вирусными регуляторами транскрипции. Этот вопрос безусловно заслуживает дальнейшего изучения.

#### 4.3. Изменение 3D генома при интеграции вирусной ДНК в геном хозяйской клетки

Проблема инсерционного мутагенеза, обусловленного интеграцией ретровирусов в геном хозяйской клетки, широко обсуждается [174–178]. При этом дискуссия касается, как правило, повреждения собственно генов либо стимуляции транскрипции клеточных генов, попавших под контроль вирусных промоторов и энхансеров [177, 179]. Мы предлагаем посмотреть на эту проблему в контексте 3D-организации генома.

Прежде всего, стоит упомянуть, что после интеграции в геном вирусы могут использовать предсуществующую геномную архитектуру для активации транскрипции удаленных генов хозяина [180] (рис. 2Б). Этот механизм показан, в частности, для активации гена циклина D1 (*Ccnd1*) ретровирусами, интегрированными в геном на значительном расстоянии (100 и 170 т.п.н.) перед этим геном [180]. Аналогичным образом осуществляется активация онкогена *c-myc* вирусами лейкоза мышей (MLV), интегрированными в геном на значительных расстояниях от промотора этого онкогена [181]. Исследования, выполненные с использованием полногеномных методов анализа, показали, что предпочтительные места интеграции в геном различных ретровирусов, вызывающих развитие опухолей у мышей (так называемые общие кластеры интеграции (Common Insertion Sites) [182]), на уровне пространственной организации генома колокализуются с различными онкогенами [183].

Однако ретровирусы не только используют предсуществующую 3D-организацию генома, но и направляют его реконфигурацию (рис. 2В). Так, показано, что в клетках HeLa, в геноме которых присутствуют множественные копии вируса папилломы человека (HPV), возникает *de novo* активаторный комплекс, включающий промотор гена *c-myc*, фрагмент генома HPV, интегрированный на расстоянии 500 т.п.н. перед этим промотором, и еще некий участок хромосомы 8, расположенный на расстоянии 3300 т.п.н. от интегрированного HPV-генома. Интегрированный HPV-геном играет ключевую роль в формировании данного комплекса, так как его экспериментально вызванная делеция приводит к утра-



**Рис. 2.** Индуцированная вирусом реорганизация 3D генома. **А** – возникновение (вверху) или разрушение (внизу) промотор-энхансерных контактов, направляемое вирусными белками группы EBNA, с сопутствующей активацией или дезактивацией гена хозяина. **Б** – использование предсуществующей архитектуры генома для активации гена, расположенного на значительном расстоянии от места интеграции ретровируса в геном. **В** – создание нового активаторного блока путем привлечения энхансера и промотора к месту интеграции ретровируса с сопутствующей активацией транскрипции хозяйского гена. **Г** – разрушение промотор-энхансерной коммуникации в результате внедрения сайта связывания CTCF и возникновения альтернативной петли. P – промотор; E – энхансер

те всех взаимодействий и резкому снижению уровня транскрипции *c-myc* [184].

Другой интересный пример пространственной реконфигурации генома, направляемой интегрированным вирусом, предоставляет ретровирус HTLV-1. В ДНК-копии генома этого вируса присутствует сайт связывания CTCF [185]. Показано, что в хромосомах, содержащих интегрированный провирус HTLV-1, возникают многочисленные пространственные контакты между этим провирусом и удаленными геном-

ными участками, которые могут находиться на расстоянии в несколько миллионов пар нуклеотидов [186]. Установление таких контактов коррелирует с изменением профиля транскрипции. Эти изменения носят комплексный характер и не могут быть объяснены только активацией генов, находящихся в пространственном контакте с провирусом [186]. В этой связи стоит обратить внимание на то, что внедрение в геном новых сайтов связывания CTCF не только приводит к возникновению новых пространственных

контактов, но и дезорганизует предсуществующую систему таких контактов, в том числе может нарушать предсуществующие энхансер-промоторные контакты [187, 188] (рис. 2Г). Сайты связывания CTCF присутствуют и в геномах других ретровирусов [189]. Однако вклад интеграции таких ретровирусов в организацию архитектуры генома не был пока изучен.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В научной литературе можно найти много работ, констатирующих факт взаимодействия вирусспецифичных белков с функциональными компартментами клеточного ядра. В настоящем обзоре мы сфокусировали внимание на тех работах, где предлагается некое механистическое объяснение событиям, происходящим с внутриядерными компартментами под действием вирусных белков в контексте задач, которые должны решаться по мере развития инфекционного процесса. В то же время стоит сказать, что многие из опубликованных результатов не укладываются в какую-либо общую схему. Это касается, например, причин временного депонирования различных вирусных белков в ядрышке и релокализации компонентов ядрышка в нуклеоплазму [39–41]. Некоторое время назад были опубликованы результаты, свидетельствующие о том, что большую роль в поддержании структурно-функциональной организации ядрышка играют присутствующие в ядрышке транскрипты ретроэлементов SINE (aluRNA) [190, 191]. В других исследованиях показано, что транскрипция ретроэлементов SINE активируется в ходе инфекции клеток рядом ДНК-содержащих вирусов [192]. Вопрос о том, влияет ли сверхэкспрессия этих РНК на структуру ядрышка, остается открытым. Можно полагать, что интегральная картина станет более ясной по мере накопления новых наблюдений.

Индукцированные вирусами изменения 3D-структуры генома привлекли внимание исследователей лишь в последние несколько лет. Учитывая ограниченное количество публикаций на эту тему, можно лишь

предполагать, что эти изменения являются частью стратегии вируса по обеспечению контроля над работой клеточного генома. Предположение это безусловно нуждается в дальнейших подтверждениях. Среди перспективных направлений можно указать на изучение возможности реконфигурации 3D генома посредством транскрипции клеточной ДНК, индуцированной с промоторов генома провирусов, интегрированных в клеточный геном [179, 193, 194]. В настоящее время такая транскрипция анализируется лишь в контексте возможности активации расположенных рядом генов. Между тем показано, что интергенная транскрипция способствует удалению когезина с сайтов связывания CTCF [162], что, безусловно, должно приводить к реконфигурации 3D генома.

Еще одним перспективным направлением исследований представляется возможность модификации профиля разделения хромосом на ТАДы при активации транскрипции провирусов. В настоящее время показано, что активация транскрипции эндогенного ретротранспозона может приводить к разделению ТАДа [195]. Можно предполагать, однако, что и активная транскрипция провирусов, интегрированных в клеточный геном при ретровирусной инфекции, будет приводить к аналогичным последствиям. Безусловно интересным представляется и продолжение изучения возможности изменения пространственной организации генома под действием вирусных белков, связывающихся с регуляторными участками генома клетки-хозяина. Нет никаких оснований предполагать, что этот феномен ограничивается лишь белками EBNA вируса Эпштейна–Барр, у которых такой эффект уже показан [169, 170]. Новые работы по перечисленным и ряду других связанных направлений существенно расширят наши представления о механизмах реализации процесса инфекции клеток различными вирусами. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта  
РФФИ № 18-29-07001.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ulianov S.V., Gavrilov A.A., Razin S.V. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. V. 315. P. 183–244.
2. Cremer T., Cremer C. // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 292–301.
3. Cremer T., Cremer M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. a003889.
4. Cremer T., Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke B., Schrock E., Speicher M.R., Mathieu U., Jauch A., Emmerich P., et al. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1993. V. 58. P. 777–792.
5. Cremer T., Cremer M., Hubner B., Silaharoglu A., Hendzel M., Lanctot C., Strickfaden H., Cremer C. // *Bioessays.* 2020. V. 42. P. e1900132.
6. Cremer T., Cremer M., Cremer C. // *Biochemistry (Moscow).* 2018. V. 83. P. 313–325.
7. Huang S. // *J. Cell. Biol.* 2002. V. 157. P. 739–741.
8. Lamond A.I., Spector D.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 4. P. 605–612.
9. Spector D.L., Lamond A.I. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. P. a000646.
10. Machyna M., Heyn P., Neugebauer K.M. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2013. V. 4. P. 17–34.
11. Wang Q., Sawyer I.A., Sung M.H., Sturgill D., Shevtsov S.P., Pegoraro G., Hakim O., Baek S., Hager G.L., Dundr M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10966.
12. Brown J.M., Green J., das Neves R.P., Wallace H.A., Smith A.J., Hughes J., Gray N., Taylor S., Wood W.G., Higgs D.R., et al. // *J. Cell. Biol.* 2008. V. 182. P. 1083–1097.
13. Chen Y., Belmont A.S. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2019. V. 55.

- P. 91–99.
14. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozcy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., et al. // *Science*. 2009. V. 326. P. 289–293.
  15. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 376–380.
  16. Dixon J.R., Gorkin D.U., Ren B. // *Mol. Cell*. 2016. V. 62. P. 668–680.
  17. Nora E.P., Lajoie B.R., Schulz E.G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., van Berkum N.L., Meisig J., Sedat J., et al. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 381–385.
  18. Lupianez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R., et al. // *Cell*. 2015. V. 161. P. 1012–1025.
  19. Symmons O., Uslu V.V., Tsujimura T., Ruf S., Nassari S., Schwarzer W., Ettwiller L., Spitz F. // *Genome Res*. 2014. V. 24. P. 390–400.
  20. Razin S.V., Ulianov S.V. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2017. V. 22. P. 18.
  21. Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., et al. // *Cell*. 2014. V. 159. P. 1665–1680.
  22. Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C., Durand N.C., Huntley M.H., Jewett A.I., Bochkov I.D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. E6456–E6465.
  23. Krivega I., Dean A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. P. 79–85.
  24. Krivega I., Dean A. // *Nat. Cell. Biol.* 2017. V. 19. P. 883–885.
  25. Kaiser V.B., Semple C.A. // *F1000Res*. 2017. V. 6. P. F1000 Fac. Rev.-314.
  26. Ibrahim D.M., Mundlos S. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2020. V. 64. P. 1–9.
  27. Achinger-Kawecka J., Taberlay P.C., Clark S.J. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2016. V. 81. P. 41–51.
  28. Valton A.L., Dekker J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016. V. 36. P. 34–40.
  29. Hu S., Lv P., Yan Z., Wen B. // *Epigenetics Chromatin*. 2019. V. 12. P. 43.
  30. Quinodoz S.A., Ollikainen N., Tabak B., Palla A., Schmidt J.M., Detmar E., Lai M.M., Shishkin A.A., Bhat P., Takei Y., et al. // *Cell*. 2018. V. 174. P. 744–757.
  31. Chen Y., Zhang Y., Wang Y., Zhang L., Brinkman E.K., Adam S.A., Goldman R., van Steensel B., Ma J., Belmont A.S. // *J. Cell. Biol.* 2018. V. 217. P. 4025–4048.
  32. Xu M., Cook P.R. // *J. Cell. Biol.* 2008. V. 181. P. 615–623.
  33. Schoenfelder S., Fraser P. // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. P. 437–455.
  34. Schoenfelder S., Sexton T., Chakalova L., Cope N.F., Horton A., Andrews S., Kurukuti S., Mitchell J.A., Umlauf D., Dimitrova D.S., et al. // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. P. 53–61.
  35. Razin S.V., Gavrilov A.A., Ioudinkova E.S., Iarovaia O.V. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1840–1847.
  36. Cook P.R., Marenduzzo D. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 9895–9906.
  37. Iarovaia O.V., Minina E.P., Sheval E.V., Onichtchouk D., Dokudovskaya S., Razin S.V., Vassetzky Y.S. // *Trends Cell. Biol.* 2019. V. 29. P. 647–659.
  38. Calle A., Ugrinova I., Epstein A.L., Bouvet P., Diaz J.J., Greco A. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 4762–4773.
  39. Salvetti A., Greco A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1842. P. 840–847.
  40. Rawlinson S.M., Moseley G.W. // *Cell. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 1108–1120.
  41. Hiscox J.A., Whitehouse A., Matthews D.A. // *Proteomics*. 2010. V. 10. P. 4077–4086.
  42. Strang B.L. // *J. Gen. Virol.* 2015. V. 96. P. 239–252.
  43. Hiscox J.A. // *Arch. Virol.* 2002. V. 147. P. 1077–1089.
  44. Hiscox J.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 119–127.
  45. Wang L., Ren X.M., Xing J.J., Zheng A.C. // *Virol. Sin.* 2010. V. 25. P. 151–157.
  46. Calderone A., Licata L., Cesareni G. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. D588–D592.
  47. Guirimand T., Delmotte S., Navratil V. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. D583–D587.
  48. Nouri K., Moll J.M., Milroy L.G., Hain A., Dvorsky R., Amin E., Lenders M., Nagel-Steger L., Howe S., Smits S.H., et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0143634.
  49. Reyes E.D., Kulej K., Pancholi N.J., Akhtar L.N., Avgousti D.C., Kim E.T., Bricker D.K., Spruce L.A., Koniski S.A., Seeholzer S.H., et al. // *Mol. Cell Proteomics*. 2017. V. 16. P. 2079–2097.
  50. Emmott E., Wise H., Loucaides E.M., Matthews D.A., Digard P., Hiscox J.A. // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. P. 5335–5345.
  51. Ni L., Wang S., Zheng C. // *J. Med. Microbiol.* 2012. V. 61. P. 1637–1643.
  52. Jia W., Yao Z., Zhao J., Guan Q., Gao L. // *Life Sci.* 2017. V. 186. P. 1–10.
  53. Chaudhry U., Malik D.A., Saleem N., Malik M.T. // *EC Microbiology*. 2018. V. 14. P. 631–640.
  54. Gao Z., Hu J., Wang X., Yang Q., Liang Y., Ma C., Liu D., Liu K., Hao X., Gu M., et al. // *Arch. Virol.* 2018. V. 163. P. 2775–2786.
  55. Dong D., Zhu S., Miao Q., Zhu J., Tang A., Qi R., Liu T., Yin D., Liu G. // *J. Gen. Virol.* 2020. V. 101. P. 33–43.
  56. Bian W.X., Xie Y., Wang X.N., Xu G.H., Fu B.S., Li S., Long G., Zhou X., Zhang X.L. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. 56–68.
  57. Tosoni E., Frasson I., Scalabrin M., Perrone R., Butovskaya E., Nadai M., Palu G., Fabris D., Richter S.N. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. 8884–8897.
  58. Kalt I., Borodianskiy-Shteinberg T., Schachor A., Sarid R. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 2935–2945.
  59. Gouzil J., Fablet A., Lara E., Caignard G., Cochet M., Kundlitz C., Palmarini M., Varela M., Breard E., Sailleau C., et al. // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e01263–16.
  60. Banerjee R., Weidman M.K., Navarro S., Comai L., Dasgupta A. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. P. 2315–2322.
  61. Amineva S.P., Aminev A.G., Palmenberg A.C., Gern J.E. // *J. Gen. Virol.* 2004. V. 85. P. 2969–2979.
  62. Ponti D., Troiano M., Bellenchi G.C., Battaglia P.A., Gigliani F. // *BMC Cell. Biol.* 2008. V. 9. P. 32.
  63. Zhu C., Zheng F., Zhu J., Liu M., Liu N., Li X., Zhang L., Deng Z., Zhao Q., Liu H. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 94519–94527.
  64. Yan Y., Du Y., Wang G., Li K. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 17761.
  65. Kao C.F., Chen S.Y., Lee Y.H. // *J. Biomed. Sci.* 2004. V. 11. P. 72–94.
  66. Ahuja R., Kapoor N.R., Kumar V. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1853. P. 1783–1795.
  67. Rajput P., Shukla S.K., Kumar V. // *Virol. J.* 2015. V. 12. P. 62.
  68. Pyper J.M., Clements J.E., Zink M.C. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 7697–7702.
  69. Li Y.J., Macnaughton T., Gao L., Lai M.M. // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 6478–6486.
  70. Behrens R.T., Aligeti M., Pocock G.M., Higgins C.A., Sherer N.M. // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e02107–16.
  71. Michienzi A., Cagnon L., Bahner I., Rossi J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 8955–8960.
  72. Zolotukhin A.S., Felber B.K. // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 120–127.
  73. Vercauteren T., Daelemans D. // *Curr. HIV Res.* 2013. V. 11. P. 623–634.
  74. Charman M., Weitzman M.D. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 151.

75. Hidalgo P., Gonzalez R.A. // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. P. 3518–3530.
76. Shulla A., Randall G. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 32. P. 82–88.
77. Crump C. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1045. P. 23–44.
78. Sagou K., Uema M., Kawaguchi Y. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 2110–2121.
79. Strang B.L., Boulant S., Coen D.M. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 1771–1784.
80. Terrier O., Carron C., De Chassesey B., Dubois J., Traversier A., Julien T., Cartet G., Proust A., Hacot S., Ressenkoff D., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 29006.
81. Su W.C., Hsu S.F., Lee Y.Y., Jeng K.S., Lai M.M. // *J. Virol.* 2015. V. 89. P. 11245–11255.
82. Yang C., Liu X., Gao Q., Cheng T., Xiao R., Ming F., Zhang S., Jin M., Chen H., Ma W., et al. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01042–18.
83. Ruiz Z., Mihaylov I.S., Cotmore S.F., Tattersall P. // *Virology.* 2011. V. 410. P. 375–384.
84. Majumder K., Wang J., Bofetsi M., Fuller M.S., Rede J.E., Joshi T., Pintel D.J. // *Elife.* 2018. V. 7. P. e37750.
85. Adeyemi R.O., Landry S., Davis M.E., Weitzman M.D., Pintel D.J. // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. P. e1001141.
86. Deng X., Yan Z., Cheng F., Engelhardt J.F., Qiu J. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. P. e1005399.
87. Schwartz R.A., Carson C.T., Schuberth C., Weitzman M.D. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 6269–6278.
88. Luo Y., Chen A.Y., Qiu J. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 133–145.
89. McKinney C.C., Hussmann K.L., McBride A.A. // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 2450–2469.
90. Weitzman M.D., Fradet-Turcotte A. // *Annu. Rev. Virol.* 2018. V. 5. P. 141–164.
91. Jang M.K., Shen K., McBride A.A. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. P. e1004117.
92. Jackson D.A., Hassan A.B., Errington R.J., Cook P.R. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 1059–1065.
93. Eskiw C.H., Rapp A., Carter D.R., Cook P.R. // *J. Cell. Sci.* 2008. V. 121. P. 1999–2007.
94. Carter D.R., Eskiw C., Cook P.R. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 585–589.
95. Chen C.P., Lyu Y., Chuang F., Nakano K., Izumiya C., Jin D., Campbell M., Izumiya Y. // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e02491–16.
96. Baquero-Perez B., Whitehouse A. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. P. e1005274.
97. Li L., Johnson L.A., Dai-Ju J.Q., Sandri-Goldin R.M. // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e1491.
98. Jenkins H.L., Spencer C.A. // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 9872–9884.
99. Girard C., Will C.L., Peng J., Makarov E.M., Kastner B., Lemm I., Urlaub H., Hartmuth K., Luhrmann R. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 994.
100. Galganski L., Urbanek M.O., Krzyzosiak W.J. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 10350–10368.
101. Simoes M., Rino J., Pinheiro I., Martins C., Ferreira F. // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 4978–4996.
102. Aspegren A., Rabino C., Bridge E. // *Exp. Cell Res.* 1998. V. 245. P. 203–213.
103. Bridge E., Xia D.X., Carmo-Fonseca M., Cardinali B., Lamond A.I., Pettersson U. // *J. Virol.* 1995. V. 69. P. 281–290.
104. Park R., Miller G. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01254–18.
105. Jimenez-Garcia L.F., Spector D.L. // *Cell.* 1993. V. 73. P. 47–59.
106. Bridge E., Riedel K.U., Johansson B.M., Pettersson U. // *J. Cell. Biol.* 1996. V. 135. P. 303–314.
107. Chang L., Godinez W.J., Kim I.H., Tektonidis M., de Lanerolle P., Eils R., Rohr K., Knipe D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. E136–144.
108. Melcak I., Cermanova S., Jirsova K., Koberna K., Malinsky J., Raska I. // *Mol. Biol. Cell.* 2000. V. 11. P. 497–510.
109. Spector D.L., Fu X.D., Maniatis T. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 3467–3481.
110. Mor A., White A., Zhang K., Thompson M., Esparza M., Munoz-Moreno R., Koide K., Lynch K.W., Garcia-Sastre A., Fontoura B.M. // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16069.
111. Fox A.H., Lamond A.I. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. a000687.
112. Nakagawa S., Hirose T. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. P. 3027–3036.
113. Pisani G., Baron B. // *Noncoding RNA Res.* 2019. V. 4. P. 128–134.
114. Ma H., Han P., Ye W., Chen H., Zheng X., Cheng L., Zhang L., Yu L., Wu X., Xu Z., et al. // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e02250–16.
115. Zhang Q., Chen C.Y., Yedavalli V.S., Jeang K.T. // *mBio.* 2013. V. 4. P. e00596–12.
116. Saha S., Murthy S., Rangarajan P.N. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. P. 1991–1995.
117. Wang Z., Fan P., Zhao Y., Zhang S., Lu J., Xie W., Jiang Y., Lei F., Xu N., Zhang Y. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. P. 1117–1131.
118. Imamura K., Imamachi N., Akizuki G., Kumakura M., Kawaguchi A., Nagata K., Kato A., Kawaguchi Y., Sato H., Yoneda M., et al. // *Mol. Cell.* 2014. V. 53. P. 393–406.
119. Ahn J.H., Hayward G.S. // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 4599–4613.
120. Chelbi-Alix M.K., de The H. // *Oncogene.* 1999. V. 18. P. 935–941.
121. Everett R.D., Freemont P., Saitoh H., Dasso M., Orr A., Kalthoria M., Parkinson J. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 6581–6591.
122. Adamson A.L., Kenney S. // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 2388–2399.
123. Everett R.D. // *Oncogene.* 2001. V. 20. P. 7266–7273.
124. Tavalai N., Stamminger T. // *Viruses.* 2009. V. 1. P. 1240–1264.
125. Stepp W.H., Meyers J.M., McBride A.A. // *mBio.* 2013. V. 4. P. e00845–13.
126. Mitchell A.M., Hirsch M.L., Li C., Samulski R.J. // *J. Virol.* 2014. V. 88. P. 925–936.
127. Bonilla W.V., Pinschewer D.D., Klenerman P., Rousson V., Gaboli M., Pandolfi P.P., Zinkernagel R.M., Salvato M.S., Hengartner H. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 3810–3818.
128. Boutell C., Cuchet-Lourenco D., Vanni E., Orr A., Glass M., McFarlane S., Everett R.D. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. P. e1002245.
129. Smith M.C., Boutell C., Davido D.J. // *Future Virol.* 2011. V. 6. P. 421–429.
130. Lee H.R., Kim D.J., Lee J.M., Choi C.Y., Ahn B.Y., Hayward G.S., Ahn J.H. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 6527–6542.
131. Schreiner S., Wimmer P., Sirma H., Everett R.D., Blanchette P., Groitl P., Dobner T. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 7029–7038.
132. Leppard K.N., Emmott E., Cortese M.S., Rich T. // *J. Gen. Virol.* 2009. V. 90. P. 95–104.
133. Ullman A.J., Hearing P. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 7325–7335.
134. Rivera-Molina Y.A., Martinez F.P., Tang Q. // *World J. Virol.* 2013. V. 2. P. 110–122.
135. Ishov A.M., Maul G.G. // *J. Cell. Biol.* 1996. V. 134. P. 815–826.
136. Maul G.G., Ishov A.M., Everett R.D. // *Virology.* 1996. V. 217. P. 67–75.
137. Everett R.D. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. P. e1003386.
138. Everett R.D., Murray J. // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 5078–5089.
139. Stubbe M., Mai J., Paulus C., Stubbe H.C., Berscheminski J., Karimi M., Hofmann S., Weber E., Hadian K., Hay R., et al. //

- mBio. 2020. V. 11. P. e00049–20.
140. Reuter N., Schilling E.M., Scherer M., Muller R., Stamminger T. // *J. Virol.* 2017. V. 91. P. e02335–16.
141. Schmid M., Speiseder T., Dobner T., Gonzalez R.A. // *J. Virol.* 2014. V. 88. P. 1404–1420.
142. Nagaraju T., Sugden A.U., Sugden B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 24630–24638.
143. Kobiler O., Brodersen P., Taylor M.P., Ludmir E.B., Enquist L.W. // *mBio.* 2011. V. 2. P. e00278–11.
144. Tomer E., Cohen E.M., Drayman N., Afriat A., Weitzman M.D., Zaritsky A., Kobiler O. // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 9388–9403.
145. Li Z., Fang C., Su Y., Liu H., Lang F., Li X., Chen G., Lu D., Zhou J. // *Virol. J.* 2016. V. 13. P. 65.
146. Taylor T.J., Knipe D.M. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 5856–5866.
147. Dembowski J.A., DeLuca N.A. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. P. e1004939.
148. Strom A.R., Brangwynne C.P. // *J. Cell. Sci.* 2019. V. 132. P. jcs235093.
149. Uversky V.N. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. V. 239. P. 97–114.
150. Tamarozzi E.R., Giuliatti S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 198.
151. Pelka P., Ablack J.N., Fonseca G.J., Yousef A.F., Mymryk J.S. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 7252–7263.
152. Xue B., Blocquel D., Habchi J., Uversky A.V., Kurgan L., Uversky V.N., Longhi S. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 6880–6911.
153. Peng Q., Wang L., Qin Z., Wang J., Zheng X., Wei L., Zhang X., Zhang X., Liu C., Li Z., et al. // *J. Virol.* 2020. V. 94. P. e01771–19.
154. Taylor T.J., McNamee E.E., Day C., Knipe D.M. // *Virology.* 2003. V. 309. P. 232–247.
155. McSwiggen D.T., Hansen A.S., Teves S.S., Marie-Nelly H., Hao Y., Heckert A.B., Umamoto K.K., Dugast-Darzacq C., Tjian R., Darzacq X. // *Elife.* 2019. V. 8. P. e47098.
156. Denker A., de Laat W. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. P. 1357–1382.
157. Sati S., Cavalli G. // *Chromosoma.* 2017. V. 126. P. 33–44.
158. Hensel K.O., Cantner F., Bangert F., Wirth S., Postberg J. // *Epigenetics Chromatin.* 2018. V. 11. P. 34.
159. Moreau P., Cournac A., Palumbo G.A., Marbouty M., Mortaza S., Thierry A., Cairo S., Lavigne M., Koszul R., Neuveut C. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 4268.
160. Kim K.D., Tanizawa H., De Leo A., Vladimirova O., Kossenkova A., Lu F., Showe L.C., Noma K.I., Lieberman P.M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 877.
161. Moquin S.A., Thomas S., Whalen S., Warburton A., Fernandez S.G., McBride A.A., Pollard K.S., Miranda J.L. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01413–17.
162. Heinz S., Texari L., Hayes M.G.B., Urbanowski M., Chang M.W., Givarkes N., Rialdi A., White K.M., Albrecht R.A., Pache L., et al. // *Cell.* 2018. V. 174. P. 1522–1536.
163. Rutkowski A.J., Erhard F., L'Hernault A., Bonfert T., Schilhabel M., Crump C., Rosenstiel P., Efstathiou S., Zimmer R., Friedel C.C., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7126.
164. Hennig T., Michalski M., Rutkowski A.J., Djakovic L., Whisnant A.W., Friedl M.S., Jha B.A., Baptista M.A.P., L'Hernault A., Erhard F., et al. // *PLoS Pathog.* 2018. V. 14. P. e1006954.
165. Kanda T. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1045. P. 377–394.
166. Farrell P.J. // *Annu. Rev. Pathol.* 2019. V. 14. P. 29–53.
167. Sall F.B., Germini D., Kovina A.P., Ribrag V., Wiels J., Toure A.O., Iarovaia O.V., Lipinski M., Vassetzky Y. // *Biochemistry (Moscow).* 2018. V. 83. P. 402–410.
168. Jiang S., Zhou H., Liang J., Gerdt C., Wang C., Ke L., Schmidt S.C.S., Narita Y., Ma Y., Wang S., et al. // *Cell Host Microbe.* 2017. V. 22. P. 561–573 e4.
169. Wood C.D., Veenstra H., Khasnis S., Gunnell A., Webb H.M., Shannon-Lowe C., Andrews S., Osborne C.S., West M.J. // *Elife.* 2016. V. 5. P. e18270.
170. McClellan M.J., Wood C.D., Ojeniyi O., Cooper T.J., Kanhere A., Arvey A., Webb H.M., Palermo R.D., Harth-Hertle M.L., Kempkes B., et al. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. P. e1003636.
171. Paschos K., Parker G.A., Watanatanasup E., White R.E., Allday M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 7233–7246.
172. Musinova Y.R., Sheval E.V., Dib C., Germini D., Vassetzky Y.S. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. P. 589–601.
173. Germini D., Tsfasman T., Klibi M., El-Amine R., Pichugin A., Iarovaia O.V., Bilhou-Nabera C., Subra F., Bou Saada Y., Sukhanova A., et al. // *Leukemia.* 2017. V. 31. P. 2515–2522.
174. Maeda N., Fan H., Yoshikai Y. // *Rev. Med. Virol.* 2008. V. 18. P. 387–405.
175. Katsura Y., Asai S. // *Am. J. Med. Sci.* 2019. V. 358. P. 384–388.
176. Johnson W.E. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. P. 355–370.
177. Bushman F.D. // *Mol. Ther.* 2020. V. 28. P. 352–356.
178. Uren A.G., Kool J., Berns A., van Lohuizen M. // *Oncogene.* 2005. V. 24. P. 7656–7672.
179. Rosewick N., Durkin K., Artesi M., Marçais A., Hahaut V., Griebel P., Arsic N., Avettand-Fenoel V., Burny A., Charlier C., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15264.
180. Pattison J.M., Wright J.B., Cole M.D. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0120256.
181. Zhang J., Markus J., Bies J., Paul T., Wolff L. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 10524–10532.
182. de Ridder J., Uren A., Kool J., Reinders M., Wessels L. // *PLoS Comput. Biol.* 2006. V. 2. P. e166.
183. Babaei S., Akhtar W., de Jong J., Reinders M., de Ridder J. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6381.
184. Shen C., Liu Y., Shi S., Zhang R., Zhang T., Xu Q., Zhu P., Chen X., Lu F. // *Int. J. Cancer.* 2017. V. 141. P. 540–548.
185. Satou Y., Miyazato P., Ishihara K., Yaguchi H., Melamed A., Miura M., Fukuda A., Nosaka K., Watanabe T., Rowan A.G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 3054–3059.
186. Melamed A., Yaguchi H., Miura M., Witkover A., Fitzgerald T.W., Birney E., Bangham C.R. // *Elife.* 2018. V. 7. P. e36245.
187. Hou C., Zhao H., Tanimoto K., Dean A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 20398–20403.
188. Rawat P., Jalan M., Sadhu A., Kanaujia A., Srivastava M. // *Mol. Cell. Biol.* 2017. V. 37. P. e00557–16.
189. Goodman M.A., Arumugam P., Pillis D.M., Loberg A., Nasimuzzaman M., Lynn D., van der Loo J.C.M., Dexheimer P.J., Keddache M., Bauer T.R., Jr., et al. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01639–17.
190. Caudron-Herger M., Pankert T., Rippe K. // *Nucleus.* 2016. V. 7. P. 308–318.
191. Caudron-Herger M., Pankert T., Seiler J., Nemeth A., Voit R., Grummt I., Rippe K. // *EMBO J.* 2015. V. 34. P. 2758–2774.
192. Schaller A.M., Tucker J., Willis I., Glaunsinger B.A. // *J. Virol.* 2020. JVI.00262–20
193. Kataoka K., Nagata Y., Kitanaka A., Shiraishi Y., Shimamura T., Yasunaga J., Totoki Y., Chiba K., Sato-Otsubo A., Nagae G., et al. // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. P. 1304–1315.
194. Sokol M., Wabl M., Ruiz I.R., Pedersen F.S. // *Retrovirology.* 2014. V. 11. P. 36.
195. Zhang Y., Li T., Preissl S., Amaral M.L., Grinstein J.D., Farah E.N., Destici E., Qiu Y., Hu R., Lee A.Y., et al. // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. P. 1380–1388.

УДК 576.342, 576.315.2, 577.214.4, 577.352.464, 615.277, 615.849.2, 616-097

# Доставка биологически активных веществ в ядра клеток-мишеней для целей трансляционной медицины

А. С. Соболев<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: alsobolev@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.06.2020

Принята к печати 25.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11049

**РЕФЕРАТ** Создание средств внутриклеточной доставки биологически активных веществ с использованием естественных процессов внутриклеточного транспорта имеет значительные перспективы в области трансляционной медицины. В обзоре обобщены результаты работ лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ИБГ РАН, позволивших создать модульные нанотранспортеры – базовую технологию, которая за счет доставки в наиболее чувствительный клеточный компартмент клеток-мишеней обеспечивает высокую эффективность и клеточную специфичность целому ряду противоопухолевых агентов и позволяет антителомиметикам проникать в нужный компартмент клеток-мишеней («ныряющие антитела»). Кроме того, разработаны и охарактеризованы комплексы поликатионных блок-сополимеров с ДНК (полиплексы), эффективные *in vitro* и *in vivo* и способные к преимущественной трансфекции активно делящихся клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** модульные нанотранспортеры, полиплексы, доставка лекарств, антителомиметики, генотерапия, фотодинамическая терапия, радиотерапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АЧ – альфа-частицы; МНТ – модульные нанотранспортеры; МНТ<sub>EGF</sub> – МНТ с EGF в качестве лигандного модуля; МНТ<sub>F</sub> – МНТ с FA в качестве лигандного модуля; МНТ<sub>MSH</sub> – МНТ с αMSH в качестве лигандного модуля; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭИ – полиэтиленимин; ФС – фотосенсибилизатор; ЭО – электроны Оже; ARE – элемент антиокислительного ответа; αMSH – α-меланоцитстимулирующий гормон; DTox – фрагмент транслокационного домена дифтерийного токсина; EC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального эффекта; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор EGF; FA – фолиевая кислота; НМР – гемоглиноподобный белок *E. coli*; K<sub>d</sub> – константа диссоциации; NLS – аминокислотная последовательность сигнала ядерной локализации; Nrf2 – фактор транскрипции, регулирующий, в частности, экспрессию генов антиокислительного ответа.

## ВВЕДЕНИЕ

Ядро клетки, где находится основная программа ее функционирования, естественным образом служит мишенью для многих биологически активных веществ. Их можно подразделить на две большие группы [1]. К первой можно отнести агенты (например, цитотоксические), которые хотя и способны производить свое повреждающее действие, находясь в любом месте клетки, однако ядро является для них наиболее чувствительным компартментом. Иначе говоря, если эти вещества локализованы в ядре, то – по сравнению с другими локализациями – для проявления такого же эффекта требуется минимальная их концентрация. Вторую группу составляют вещества, проявляющие свое действие именно тогда, когда они оказываются в клеточном ядре, как, напри-

мер, ДНК. В настоящем обзоре будут рассмотрены обе эти группы.

Фотосенсибилизаторы (ФС) и радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом, такие, как эмиттеры альфа-частиц (АЧ) или эмиттеры электронов Оже (ЭО), могут служить примерами веществ первой группы. И те и другие являются цитотоксическими агентами, широко используемыми в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний, но не только их. К цитотоксическому началу ФС – активным формам кислорода (т.е. к синглетному кислороду, гидроксильному радикалу и ряду других свободных радикалов) – чрезвычайно чувствительно клеточное ядро [2]. Что касается эмиттеров АЧ и ЭО, то уже более полувека известно, что именно клеточное ядро является наиболее чув-

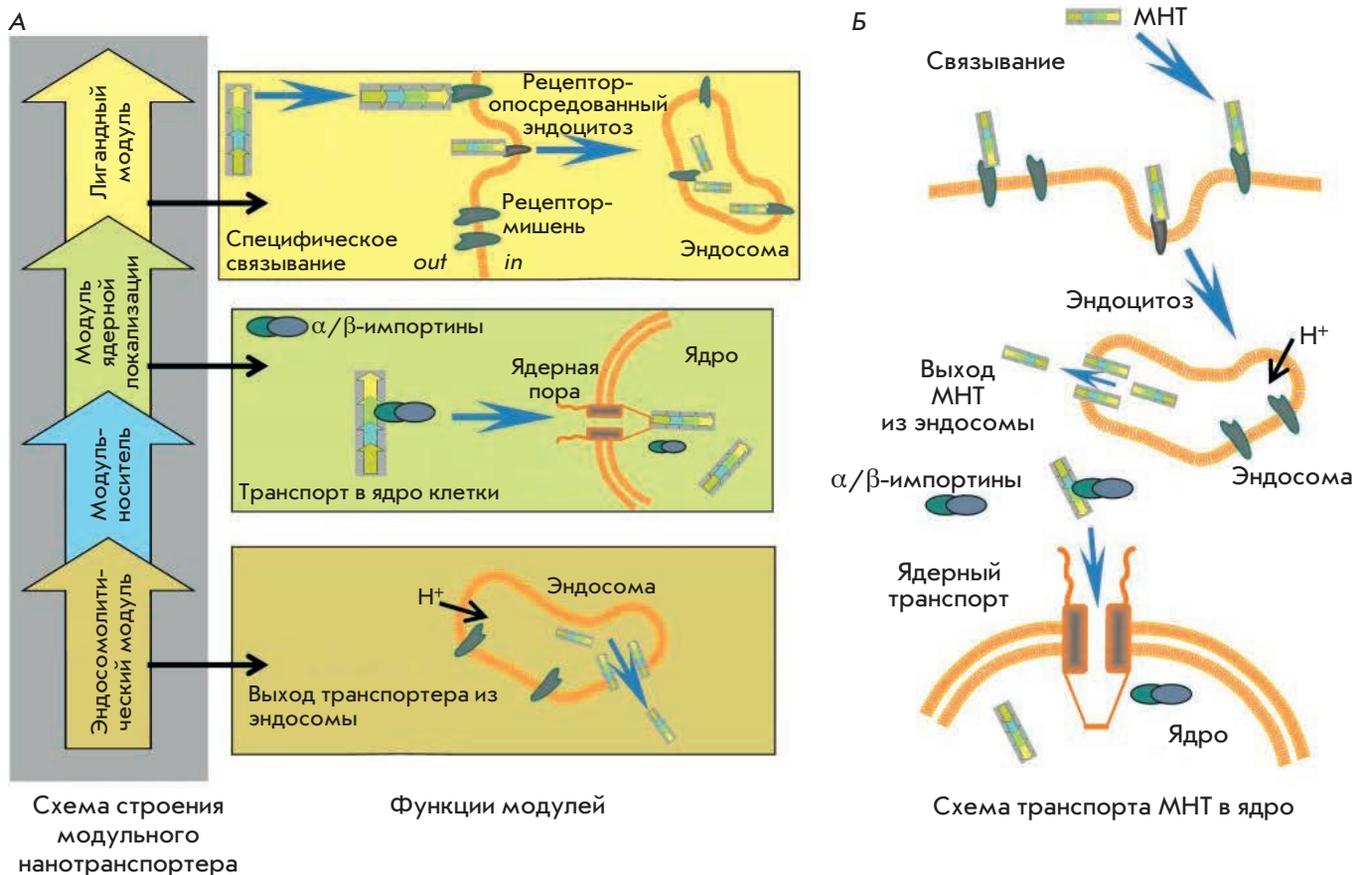


Рис. 1. Схема строения модульных нанотранспортеров (А) и их транспорта в клеточное ядро (Б) (по [15])

ствительным к ним клеточным компартментом [3]. При этом как ФС, так и эмиттеры АЧ/ЭО не только не обладают тропностью в отношении клеточного ядра, но и не имеют клеточной специфичности.

Не вызывает сомнений и необходимость доставки ДНК в клеточное ядро, если возникает потребность в ее экспрессии. К этой же, второй, группе биологически активных веществ следует отнести те регуляторные полипептиды, эффект которых проявляется при взаимодействии с макромолекулами клеточного ядра.

Таким образом, в целях трансляционной медицины биологически активные агенты необходимо доставить в ядра клеток-мишеней, чтобы их свойства могли проявиться, поскольку подавляющее большинство этих агентов не способны сами проделать этот путь.

Основная стратегия доставки макромолекул или иных биологически активных веществ (для краткости именуемых дальше «грузы») – использование естественных внутриклеточных транспортных процессов, таких, как, например, рецептор-опосредованный эндоцитоз или цитоплазмально-ядерный транспорт (они описаны в многочисленных книгах и обзорах, например, [4, 5]). Соответственно переносчик должен иметь необходимые для перемещения в желаемом направлении аминокислотные по-

следовательности или иные адресные молекулы и быть способным на пути к ядру преодолеть многочисленные барьеры как на пути к клетке-мишени [6], так и внутри нее.

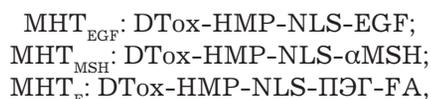
**МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ**

Этим условиям соответствуют разрабатываемые в нашей лаборатории модульные нанотранспортеры (МНТ), которые можно рассматривать как технологическую платформу для доставки терапевтических агентов в заданный компартмент клеток-мишеней желаемого типа [1, 7–16]. В основу этой платформы положено: а) использование естественных процессов специфического молекулярного распознавания, а также б) уже упомянутых процессов транспорта внутрь и внутри клетки и в) принципа модульности, т.е. возможности менять транспортные или распознающие блоки/модули, чтобы адаптировать МНТ к нужному типу клеток-мишеней, клеточных компартментов, внутриклеточных мишеней и доставляемого «груза». В типичном варианте МНТ (рис. 1) в их состав входят лигандный модуль, эндосомолизисный модуль, модуль транспорта в ядро клетки и модуль-носитель. Лигандный модуль обеспечивает взаимодействие с поверхностным интер-

нализуемым клеточным рецептором и тем самым узнавание клетки-мишени и транспорт внутрь этой клетки путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Эндосомолитический модуль выполняет функцию рН-зависимого порообразования в эндосомах, чем обеспечивает выход МНТ с доставляемым активным компонентом в цитозоль клетки-мишени из этих компартментов со слабокислым содержимым. Модуль транспорта в ядро клетки-мишени включает аминокислотную последовательность, представляющую собой сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS), который специфически взаимодействует с комплексом импортинов в цитозоле и обеспечивает транспорт через ядерную пору. Модуль-носитель служит для объединения остальных модулей в единое целое и присоединения «груза». Помимо четырех перечисленных модулей в состав МНТ могут быть включены и другие модули, если нужно дополнительное взаимодействие с еще какими-то внутриклеточными и внеклеточными компонентами. К настоящему времени наиболее детально исследованы свойства *in vitro* и *in vivo*:

- МНТ с эпидермальным фактором роста (EGF) в качестве лигандного модуля (МНТ<sub>EGF</sub>), обладающие специфичностью по отношению к клеткам<sup>1</sup>, сверхэкспрессирующим рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) [9, 19, 20],
- МНТ с  $\alpha$ -меланоцитстимулирующим гормоном в качестве лигандного модуля (МНТ<sub>MSH</sub>), специфичные к клеткам<sup>2</sup> со сверхэкспрессией рецепторов меланокортина первого типа [8, 12, 22],
- МНТ с фолиевой кислотой в качестве лигандного модуля (МНТ<sub>F</sub>), нацеленные на клетки<sup>3</sup> со сверхэкспрессией рецепторов фолата [23, 24].

Состав модулей этих МНТ:



где DTox – фрагмент транслокационного домена дифтерийного токсина (эндосомолитический модуль); HMP – гемоглобиноподобный белок *E. coli* (модуль-носитель); NLS – оптимизированная последовательность ядерной локализации большого ядерного Т-антигена вируса SV40 (модуль доставки в ядро); EGF,  $\alpha$ MSH, FA – эпидермальный фактор роста,  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон, фолиевая кислота соответственно (лигандные модули); ПЭГ – бифункциональный полиэтиленгликоль.

<sup>1</sup> Примеры: клетки рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, глиобластомы, колоректального рака [17, 18].

<sup>2</sup> Пример: клетки меланомы [21].

<sup>3</sup> Примеры: клетки рака шейки матки, рака яичников [10].

Разработаны и разрабатываются другие варианты МНТ, которые будут рассмотрены в следующих разделах.

Когда в одну молекулу объединяются фрагменты других молекул, как при создании МНТ, то не очевидно, что свойства этих фрагментов сохранятся у создаваемой химерной молекулы: например, ее домены могут пространственно экранировать друг друга и препятствовать необходимому для функционирования химеры взаимодействию с клеточными белками; тем самым у создаваемой искусственной молекулы не будет желаемых свойств. Для проверки функциональности МНТ исследована как структура МНТ, так и способность их модулей осуществлять свои функции.

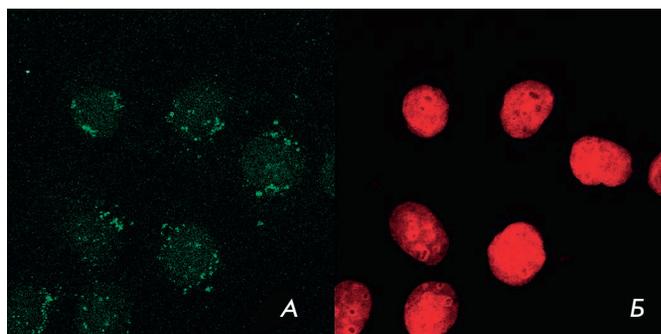
По данным динамического светорассеяния МНТ<sub>MSH</sub> и МНТ<sub>EGF</sub> имеют размеры  $8.3 \pm 0.6$  и  $10.6 \pm 0.5$  нм [19] соответственно.

Неоднократные попытки кристаллизовать МНТ с целью последующего изучения их структуры с высоким разрешением методом рентгеновской дифракции оказались безрезультатными. Однако применение методов малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, атомно-силовой и электронной микроскопии [25] позволило получить представление о структурах МНТ<sub>MSH</sub> и МНТ<sub>EGF</sub>. Один из важных выводов из этого структурного исследования состоит в том, что эндосомолитический и лигандный модули хорошо пространственно разнесены, что исключает их взаимное экранирование и, тем самым, потерю своих функций.

Это заключение убедительно подтверждено тестами, проведенными для оценки функционирования модулей МНТ всех разработанных типов. Для экономии места ограничимся примерами. Так, константа диссоциации ( $K_d$ ) комплексов МНТ<sub>EGF</sub> с EGFR составила 29 нМ, что близко к  $K_d$  комплексов EGF с EGFR [9], а для комплексов МНТ<sub>MSH</sub> с меланокортиновыми рецепторами – около 20 нМ [8]. Исследуемые МНТ обладали мембранолитической активностью в двух диапазонах рН: в интервале 5.5–6.5, который близок к рН эндосом и обусловлен DTox, и при рН от 3 до 4, обусловленный действием HMP [8, 9]. Поры в мембранах, создаваемые МНТ, охарактеризованы электрохимически и с помощью атомно-силовой микроскопии [7, 9, 22]. После добавления полноразмерных МНТ<sub>MSH</sub> (т.е. со всеми четырьмя модулями) к плоскому липидному бислою при рН 5.5 выявлено возникновение ионных каналов с проводимостью ~2–5 нСм, тогда как МНТ<sub>MSH</sub> без эндосомолитического модуля при рН 5.5 не образовывали ионных каналов. Не появлялись каналы и при действии полноразмерных МНТ<sub>MSH</sub> при нейтральных значениях рН 7.0, что доказывало проявление мембранной активности эндосомолитического модуля именно при закислении

среды. Спустя 5–15 мин после закисления среды до pH 5.5 МНТ<sub>EGF</sub> образовывали в липидном бислое кольцевые структуры диаметром 30–50 нм, что выявлено с помощью атомно-силовой микроскопии. По прошествии 40–60 мин в липидном бислое можно было обнаружить флукутирующие отверстия диаметром 50–200 нм, пронизывающие бислоем. Работу эндосомолитического модуля показали и на живых клетках (меланома мышей Клаудмана S91 (клон М3)) [8], измерив pH внутриклеточного микроокружения МНТ<sub>MSH</sub> методом видеомикроскопии отношения изображений: МНТ<sub>MSH</sub> без эндосомолитического модуля DТох находился в везикулах со слабокислым и кислым содержанием, тогда как полноразмерный МНТ<sub>MSH</sub> (с модулем DТох) оказывался в нейтральном микроокружении. Полученный результат указывал на способность полноразмерных МНТ выходить из закисляемых эндоцитозных компартментов живых клеток. Несколькими методами (поверхностный плазмонный резонанс и термофорез) охарактеризовано взаимодействие модуля с NLS в составе различных МНТ с α/β-импортиновыми димерами, обеспечивающими доставку белков с NLS в клеточное ядро [9, 26]. Измеренные значения констант сродства МНТ к импортиновым димерам были близки к значениям констант свободного природного полипептида с этим же NLS. Таким образом показали, что все модули сохранили свои функции в составе искусственной химерной молекулы МНТ.

Соответственно все полноразмерные МНТ проникали в клетки-мишени путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что подтверждалось ингибированием их проникновения специфическими лигандами соответствующих рецепторов, и локализовались в их клеточных ядрах [8, 9, 14, 23, 26–28] (рис. 2), как это



**Рис. 2.** Внутриклеточная локализация МНТ<sub>EGF</sub> в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 (по [9] с разрешения). Клетки инкубировали в течение 4 ч в среде с МНТ<sub>EGF</sub>, после отмывали и инкубировали 3 ч в среде без МНТ<sub>EGF</sub>. Одна и та же группа клеток: А – иммуноцитохимическое выявление МНТ<sub>EGF</sub>, Б – окраска ядерной ДНК (ТоPro-3)

и планировалось авторами для решения задачи внутриядерной доставки «грузов».

ФС, обычно применяемые для фотодинамической терапии злокачественных опухолей (хотя известны и другие направления их использования), генерируют свое цитотоксическое начало – активные формы кислорода – при освещении в оксигенируемой среде [2]. Как отмечено во «Введении», клеточное ядро является клеточным компартментом, наиболее чувствительным к поражающему действию как активных форм кислорода, так и эмиттеров АЧ и ЭО, применяемых в радиотерапии злокачественных опухолей [29, 30]. Поскольку МНТ показали свою способность проникать в клетки рецептор-опосредованным путем, а значит проникать в те клетки, где эти рецепторы представлены, т.е. специфически, и, главное, аккумулироваться в их ядрах, предстояло проверить, способна ли доставка эмиттеров АЧ и ЭО, а также ФС в ядра с помощью МНТ усилить их цитотоксичность.

Действительно, такие ФС, как хлорин  $e_6$  и бактериохлорин  $p$ , присоединенные к МНТ<sub>EGF</sub> или к МНТ<sub>MSH</sub>, оказывались в сотни и тысячи раз более цитотоксичными, чем в свободном состоянии. Например, в опытах на клетках А431, сверхэкспрессирующих EGFR, концентрация полумаксимального цитотоксического эффекта ( $EC_{50}$ ) МНТ<sub>EGF</sub>-хлорин  $e_6$  составила 0.53 нМ, тогда как  $EC_{50}$  свободного хлорина  $e_6$  равна 1780 нМ, т.е. в 3360 раз больше [9]. Иными словами, тот же цитотоксический эффект ФС хлорина  $e_6$  можно обеспечить, используя в 3360 раз меньшие его концентрации, переместив с помощью МНТ этот ФС в ядро. В этих же экспериментах показано, что МНТ<sub>EGF</sub> придавали ФС клеточную специфичность: если свободный хлорин  $e_6$  был одинаково цитотоксичен как в отношении клеток-мишеней А431, так и немитических фибробластов NIH 3T3, лишенных EGFR, то МНТ<sub>EGF</sub>-хлорин  $e_6$  поражали лишь клетки-мишени.

Качественно сходные результаты получены и в опытах с МНТ<sub>MSH</sub> [8], где также показана необходимость наличия всех четырех модулей в МНТ: так МНТ, лишенный эндосомолитического модуля, был в 5.3 раза менее активным, чем полноразмерный МНТ, а МНТ без модуля с NLS оказывался еще менее цитотоксичным.

В опытах *in vivo* на мышах-опухоленосителях убедительно показана эффективность доставки ФС в ядра раковых клеток с помощью МНТ [19, 31]. Иммуноцитохимический анализ распределения МНТ<sub>EGF</sub> и МНТ<sub>MSH</sub> после внутривенного введения мышам-опухоленосителям выявил их преимущественное накопление в раковых клетках, а внутри них – в ядрах. Применение МНТ<sub>MSH</sub> для терапии

двух экспериментальных меланом (внутривенное введение) показало, что ФС бактериохлорин  $p$ , доставляемый МНТ<sub>MSH</sub>, ингибировал рост опухоли V16-F1 на 85–89% эффективнее, чем свободный бактериохлорин  $p$ , а меланомы Клаудмана S90 – на 93%. Отношение концентраций ФС в опухоли и коже достигало 9.8, что в 4.5 раза лучше, чем свободного бактериохлорина  $p$  [32]. Значительный терапевтический эффект наблюдали и при внутривенном введении МНТ<sub>EGF</sub> с ФС хлорином  $e_6$  на модели эпидермоидной карциномы человека A431, привитой мышам с иммунодефицитом: 75% мышей выжили к 92 суткам при 20% выживаемости животных, получавших свободный хлорин  $e_6$  (положительный контроль) и полной гибели нелеченого контроля к 23 суткам.

АЧ и ЭО, вызывая плотную ионизацию и тем самым эффективно повреждая молекулы вдоль своих треков, обладают весьма небольшим пробегом в тканях: АЧ – 50–100 мкм, т.е. несколько клеточных диаметров, ЭО – порядка десятков и сотен нанометров, т.е. практически в пределах размеров клеточного ядра. Эти особенности эмиттеров АЧ и ЭО привлекательны тем, что в случае их избирательной доставки в клетки-мишени можно рассчитывать на минимальное повреждение окружающих нормальных клеток. При этом оба типа излучений вызывают множественные и трудно репарируемые двухцепочечные разрывы ДНК. Собственно, ядерная ДНК и является главной мишенью цитотоксического действия этих излучений [33, 34]. У них практически не происходит резкого уменьшения цитотоксичности при снижении содержания кислорода [35] (так называемого «кислородного эффекта», характерного для редкоионизирующих излучений), что дает им особое преимущество для поражения гипоксических раковых клеток. А эмиттеры ЭО интересны еще и тем, что на каждый распад продуцируют до нескольких десятков ЭО (в зависимости от природы эмиттера), что и обеспечивает их высокую биологическую эффективность, если распад происходит в непосредственной близости от ДНК [36]. С учетом перечисленных особенностей АЧ и особенно ЭО представляют интерес для терапии злокачественных опухолей, расположенных в местах, где повреждение окружающих нормальных тканей должно быть сведено к минимуму (например, опухолей мозга, особенно у детей) [37], либо для лечения микрометастазов [38].

Альфа-эмиттер  $^{211}\text{At}$ , использованный как источник АЧ в экспериментах с МНТ, рассматривают как один из радионуклидов, наиболее перспективных для терапевтических целей [30]. Альфа-эмиттер  $^{211}\text{At}$  имеет относительно короткий период полураспада (7.2 ч), пробег испускаемых им АЧ – до 70 мкм, дающий высокий выход двухцепочечных разрывов

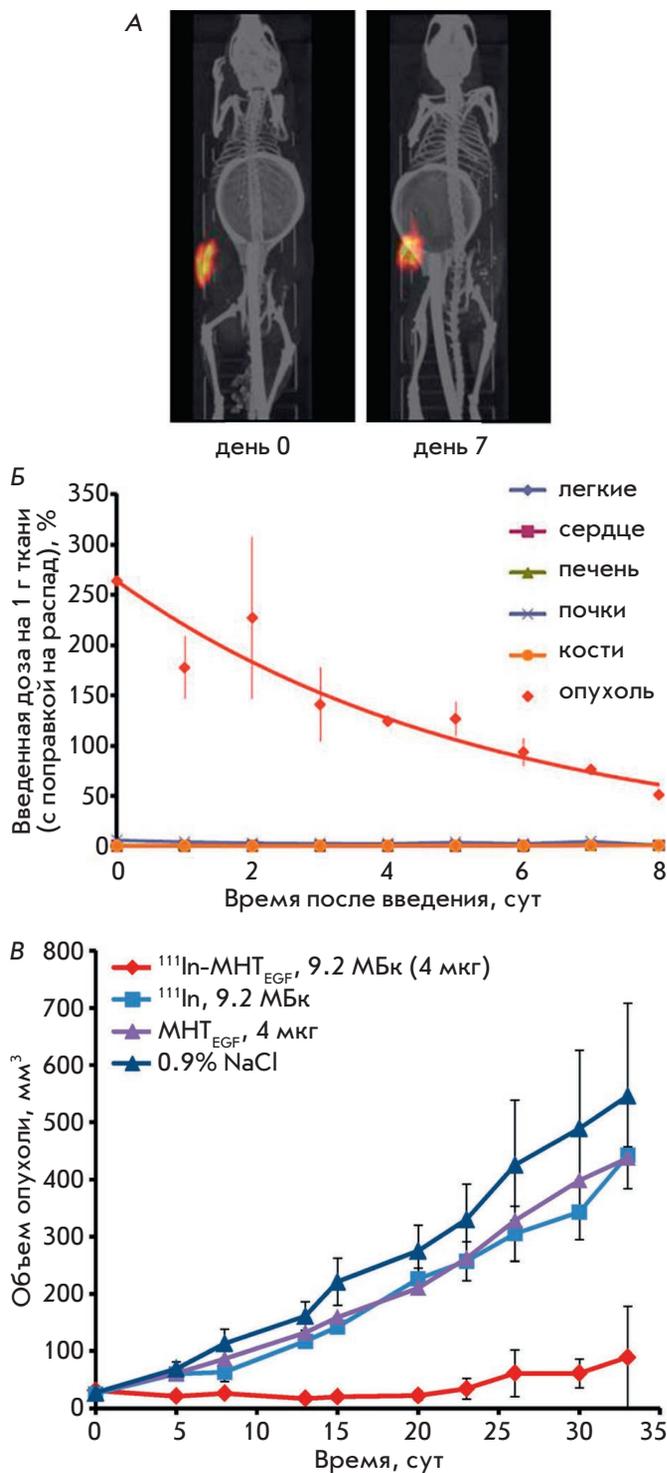
ДНК [39].  $^{211}\text{At}$ -МНТ<sub>EGF</sub> в экспериментах на клетках эпидермоидной карциномы человека A431, а также на двух линиях глиобластомы человека (D247MG и U87MG.wtEGFR) были в 8–18 раз более цитотоксичными, чем  $^{211}\text{At}$ , не транспортируемый МНТ в ядра этих клеток [40]. Причем оказалось, что доставка этого эмиттера АЧ в клеточные ядра позволила проявиться эффектам ядер отдачи, которые из-за очень короткого пробега не выявляются при иных внутриклеточных локализациях.

В экспериментах с МНТ использовали следующие эмиттеры ЭО, широко применяемые в медицине в качестве источников гамма-излучения:  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  и  $^{111}\text{In}$ . Они испускают в среднем 24.9, 4.7 и 14.7 ЭО на 1 распад соответственно [41], причем выход двухцепочечных разрывов ДНК, вызываемых ЭО, существенно зависит от расстояния между ДНК и эмиттером ЭО [42].

$^{125}\text{I}$  или  $^{67}\text{Ga}$ , доставляемые МНТ<sub>EGF</sub>, весьма интенсивно накапливались в ядрах клеток эпидермоидной карциномы человека A431 [27, 28]: к первому часу инкубации около 60% радиоактивности, доставленной в клетки, оказывалось в их ядрах.  $^{125}\text{I}$ -МНТ<sub>EGF</sub> был в 3500 раз более цитотоксичным для клеток A431, чем  $^{125}\text{I}$ -иодированный контрольный полипептид, не проникающий в клетки [27]. Похожие результаты по резкому усилению цитотоксичности эмиттеров ЭО за счет их доставки в ядра получены с  $^{67}\text{Ga}$  [28] и  $^{111}\text{In}$  [20]. В этих опытах на трех клеточных линиях (A431, D247MG и U87MG.wtEGFR) сравнили цитотоксичность  $^{125}\text{I}$  и  $^{67}\text{Ga}$ , доставленных в ядро с помощью МНТ, с их цитотоксичностью при доставке преимущественно в цитоплазму. Как и следовало ожидать, доставка этих эмиттеров в ядро обеспечивала значительно большую цитотоксичность (от 20 до 400 раз в зависимости от радионуклида и клеточной линии) [15].

Проверки безопасности МНТ, проведенные в рамках доклинических испытаний, осуществленных в «Национальном медицинском исследовательском радиологическом центре» Минздрава России, показали, что исследованные МНТ при внутриопухолевом введении обладают весьма незначительной токсичностью для мышей и крыс (как острой, так и хронической), малой иммуногенностью/аллергенностью для мышей и морских свинок и непирогенны для кроликов [19, 43–45]. В целом, считали, что этот терапевтический подход безопасен при внутриопухолевом введении МНТ [46].

$^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>EGF</sub>, однократно введенный в раковую опухоль мочевого пузыря человека EJ, привитую подкожно иммунодефицитным мышам Balb/c *nu/nu*, удерживался внутри опухоли весьма продолжительное время (время полуудержания составило  $4.1 \pm 0.5$  сут) [20], при этом в кровь поступало не более 0.5% введенной дозы. При внутриопухолевом введе-



**Рис. 3.**  $^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>EGF</sub> после введения внутрь опухоли (рак мочевого пузыря человека EJ), привитой подкожно иммунодефицитным мышам Balb/c *nu/nu* (по [20] с изменениями). А – визуализация удержания радиоактивности в опухоли методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии; Б – кинетика удержания радиоактивности в опухоли и нормальных тканях; В – противораковая эффективность  $^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>EGF</sub> при внутриопухолевом введении

нии  $^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>EGF</sub> оказывал выраженный дозозависимый терапевтический эффект на опухоли EJ (до 90% по сравнению с нелеченым контролем: как немеченым МНТ<sub>EGF</sub>, так и свободным  $^{111}\text{In}$  в той же дозе) [20] (рис. 3).

Похожую терапевтическую эффективность продемонстрировал другой вариант МНТ – МНТ<sub>F</sub> с  $^{111}\text{In}$  [23, 24].  $^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>F</sub> обеспечил дозозависимое торможение роста опухолей, привитых подкожно (клетки HeLa рака шейки матки) иммунодефицитным мышам (вплоть до 80%), при этом выживаемость животных достигла 60% (на 90-е сут) при полной гибели нелеченого контроля к 21 дню.

Результаты, полученные с различными цитотоксическими агентами (двумя ФС, одним эмиттером АЧ, тремя эмиттерами ЭО), побудили взглянуть на МНТ как на потенциальных доставщиков значительно более широкого спектра биологически активных молекул. В этом смысле особенно привлекательны биоактивные полипептиды, поскольку сами МНТ являются химерными полипептидами, и включение в их состав дополнительных полипептидных фрагментов – вопрос, решаемый генно-инженерными методами.

Один из первых вариантов таких МНТ – МНТ с фрагментом белка p21: p21-МНТ<sub>EGF</sub>. Белок p21 обладает широким спектром действия, образуя комплекс с белком PCNA, он влияет на процессы репарации ДНК, контролирует репликационную вилку ДНК, а взаимодействуя с циклинами и циклинзависимыми киназами, регулирует клеточный цикл [47]. Это делает p21 или его фрагменты, которыми он связывается с PCNA, привлекательным инструментом для модификации действия средств повреждения ДНК, используемых, например, в терапии рака. Исходя из этих отправных моментов, синтезированы p21-МНТ<sub>EGF</sub>, которые содержали С-концевой фрагмент белка p21 (аминокислотные остатки 87–164) с участком, которым p21 связывается с PCNA [48]. ДНК повреждали блеомицином – противораковым агентом, вызывающим ее двухцепочечные разрывы [49], а для анализа повреждений ДНК и ее репарации использовали метод ДНК-комет в щелочной среде, позволяющий выявлять все типы разрывов ДНК. Предварительная инкубация клеток A431 с p21-МНТ<sub>EGF</sub> показала, что p21-МНТ<sub>EGF</sub> вызывают статистически значимое ингибирование репарации ДНК по сравнению с контрольными МНТ<sub>EGF</sub>, т.е. аналогичными МНТ, но без фрагмента p21 [14].

Ободрающие результаты этого исследования способствовали дальнейшему продвижению по пути направленной внутриклеточной доставки биологически активных полипептидов. В ходе работ по гранту РФФИ № 17-14-01304 [50] были созданы МНТ, несущие в качестве эффекторной части антителомиметик

анти-Keap1 монободы, активирующий сигнальный путь Nrf2/ARE за счет конкуренции с эндогенным Nrf2 за связывание с белком-ингибитором Keap1. Транскрипционный фактор Nrf2 регулирует несколько сотен генов, часть которых участвует в защите клетки от окислительного стресса (т.е. в антиоксидантной защите), другая – в защите от токсичных ксенобиотиков и в ряде других жизненно важных процессов [51]. Окислительный стресс сопровождается или участвует в патогенезе многих заболеваний, таких, как болезни Паркинсона и Хантингтона, сахарный диабет, атеросклероз, в старении клеток, их радиационном поражении и др. [51, 52]. В отсутствие окислителей Nrf2, находящийся в цитоплазме в комплексе со своим ингибитором Keap1, подвергается убиквитинированию и последующей деградации в протеасомах. Появляющиеся в клетке окислители, ксенобиотики взаимодействуют с тиольными группами «цистеиновых сенсоров» в составе Keap1, что приводит к высвобождению Nrf2 и его накоплению в ядре с последующим взаимодействием с «элементом антиокислительного ответа» (ARE – antioxidant response element) в области промоторов контролируемых генов, активируя их транскрипцию [51, 53]. Эксперименты с МНТ, содержащими анти-Keap1 монободы, выявили статистически значимое увеличение экспрессии ряда генов антиоксидантной защиты и защиту клеток от окислительного стресса, индуцированного *трет*-бутилгидропероксидом. На мышинной модели окислительного стресса, индуцированного гепатотоксином ацетаминофеном, показано, что предварительное введение МНТ с анти-Keap1 монободы, активирующего сигнальный путь Nrf2/ARE, препятствует гепатотоксическому действию ацетаминофена, выявляемому по увеличению активности аспартат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы в сыворотке крови [50]. Эти результаты свидетельствуют о возможности применения МНТ для доставки антителомиметиков не только *in vitro*, но и *in vivo*.

### **ПОЛИПЛЕКСЫ (КОМПЛЕКСЫ КАТИОННЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ С ДНК) ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Перспектива изменять функционирование клеток, модифицируя их генетическую программу, уже не первое десятилетие стимулирует многих исследователей, ставящих своими конечными целями генотерапию (например, онкологических или наследственных заболеваний) или биотехнологию для продукции нужных макромолекул и т.п. Как нередко бывает при решении подобных значительных проблем, состоящих из нескольких крупных задач, нахождение оптимального варианта решения какой-то из них оказывается

не столь быстрым, как того хотелось бы. Задача направленной доставки генетического материала – одна из таких. Напрашивающимся вариантом решения могли быть вирусы как надмолекулярные структуры, наиболее приспособленные для преодоления организменных и клеточных барьеров при направленной доставке собственного генетического материала. Наибольшее число доклинических и клинических испытаний по генотерапии осуществлено именно с ними. Однако над вирусными векторами, по-видимому, надолго нависла угроза неожиданных и нередко тяжелых побочных эффектов [54, 55]. Поэтому параллельно с конструированием вирусных векторов для доставки генетического материала разрабатываются невирусные методы, привлекающие все больший интерес и число исследователей.

Один из вариантов невирусной доставки – применение поликатионов, образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами, называемые полиплексами. В полиплексах ДНК (или РНК) упакована и защищена от действия гидролитических ферментов, что обеспечивает достаточную стабильность в биологических средах. Полиплексы непатогенны, многие из них неиммуногенны и малотоксичны. Модифицируя исходные полимеры, можно получать различные по свойствам частицы, а также присоединять различные функциональные компоненты для придания им, например, клеточной специфичности или иных желаемых свойств [56].

Очевидно, что к позитивным качествам собственно полимерных носителей в составе полиплексов необходимо как добавление упомянутых выше функциональных компонентов, так и оптимизация состава самих полимеров для приближения свойств полиплексов к свойствам вирионов доставлять генетический материал.

Рассмотрим это на примере хорошо известных полиплексов на основе полиэтиленimina (ПЭИ). При смешивании ПЭИ с ДНК в разных соотношениях, выражаемом как отношение N/P (где N – число аминогрупп ПЭИ, а P – число фосфатных групп ДНК), образуются частицы разного размера и заряда. Для увеличения времени циркуляции полиплексов в крови и снижения токсичности ПЭИ к нему присоединяют ПЭГ, получая блок-сополимеры ПЭГ-ПЭИ. Поскольку варьировать можно не только соотношения N/P, но и ПЭГ/ПЭИ, то возникает задача нахождения оптимальных соотношений компонентов в составе полиплекса. Для ее решения на 11 клеточных линиях протестированы варианты полиплексов с различными соотношениями компонентов, а эффективность трансфекции оценивали по активности экспрессируемого репортерного гена [57]. Показано, что получаемые зависимости эффективности трансфекции от соот-

ношений N/P и ПЭГ/ПЭИ немонотонны, но близки по форме для всех исследованных клеток, и, что важно, максимумы эффективности трансфекции разных клеточных линий наблюдаются при одних и тех же отношениях N/P и ПЭГ/ПЭИ. При этом для всех исследованных линий клеток показана значимая положительная корреляция между эффективностью трансфекции и долей наночастиц полиплексов с размерами 50–75 нм. Такой результат, полученный более чем на 10 клеточных линиях человека и животных, дает возможность трансфицировать разные линии клеток с максимальной эффективностью. Однако при сходстве зависимостей трансфекции от соотношений N/P и ПЭГ/ПЭИ для всех изученных клеточных линий замечено и существенное отличие: максимально достижимая эффективность трансфекции варьировала от почти 100% (HeLa, HEK293, меланома Клаудмана, меланома V16-F1) до 4.4% (BT-474). Эти различия можно было объяснить либо различиями в экспрессии репортерного гена, либо различиями в процессах транспорта и распаковки полиплексов у разных клеточных линий. Экспериментальная проверка [57] показала правомочность второго предположения: эффективность трансфекции положительно коррелировала со скоростью входа полиплексов в клетки и отрицательно – со скоростью их распаковки в эндцитозных компартментах.

Модификация блок-сополимеров лигандами к интернализуемым рецепторам на клетках-мишенях позволяет придавать полиплексам клеточную специфичность. Например, полиплексы с  $\alpha$ MSH приобретали специфичность по отношению к клеткам меланомы, сверхэкспрессирующим меланокортиновые рецепторы 1-го типа ( $\alpha$ MSH – их лиганд), и намного более эффективно трансфицировали эти раковые клетки *in vivo* [58].

Размер наиболее эффективно трансфицирующих полиплексов на основе ПЭИ (50–75 нм; см. выше) заставляет сомневаться, что наночастицы такого размера способны проникнуть через ядерные поры в ядро неделящейся клетки, поскольку их известный предел даже для частиц, имеющих NLS, – около 40 нм [59]. Эксперименты по исследованию трансфекции флуоресцентно мечеными полиплексами клеток показали, что около 90% клеток, экспрессирующих репортерный ген, доставляемый этими наночастицами, были трансфицированы именно в ходе своего деления [60], что позволяет рассматривать полиплексы как средство, подходящее для трансфекции активно делящихся, в первую очередь раковых, клеток. В этом же исследовании [60] оценено среднее число интактных молекул ДНК, приходящихся на одно ядро успешно трансфицированной клетки; оно оказалось равным примерно трем, что указыва-

ет на немалую эффективность полиплексов. В пользу целесообразности использования полиплексов в генотерапии рака говорят и их физические свойства: раковые опухоли, точнее их сосуды, обладают свойством так называемого эффекта «усиленной проницаемости и удерживания» наночастиц [61]. Полиплексы на основе ПЭИ, модифицированные  $\alpha$ MSH, с разной эффективностью трансфицировали клетки меланомы V16-F1 и Клаудмана S91: первые лучше, чем вторые. Как показано, причина различий состоит в том, что опухоли V16-F1 более васкуляризованы, и в их эндотелии больше фенестр, что способствует более выраженному эффекту «усиленной проницаемости и удерживания» [62]. Тем не менее опухолевые ткани представляют собой определенный барьер для наночастиц полиплексов. Эти наночастицы, хотя и проникают в опухолевые ткани в отличие от нормальных, но глубина их проникновения невелика: не более 20 мкм [63] (рис. 4А). Поэтому, если есть необходимость в доставке полиплексов на большую глубину в опухоль, то нужны дополнительные воздействия на нее. Один из вариантов, позволяющий как увеличить глубину проникновения полиплексов, так и их концентрацию в опухоли, – модифицировать ее интерстиций, например, подавив продукцию коллагена типа I [62, 64] (рис. 4Б).

Полиплексы на основе ПЭИ продемонстрировали терапевтическую эффективность в случае экспериментальных опухолей (саркома мышцей S37 [65] и меланома Клаудмана S91, клон M3 [58]). В более ранних экспериментах при трансфекции молочных желез мышцей и овец полиплексами удалось получить с их молоком желаемый белок [66]. Такими же полиплексами можно было осуществить трансгенез ранних эмбрионов мышцей и кроликов [67].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подытоживая результаты проведенных работ можно сделать следующие выводы.

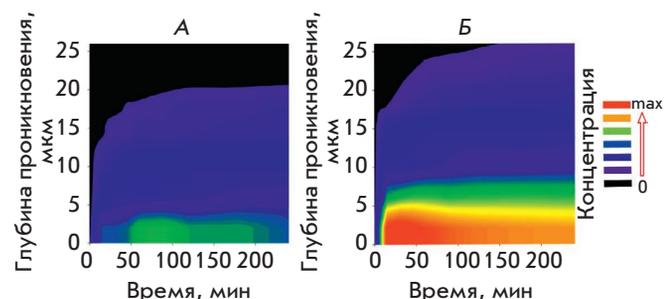


Рис. 4. Проникновение полиплексов в опухоль (по [62] с разрешения); А – без воздействий; Б – после ингибирования продукции коллагена I лозартаном

А) По доставке цитотоксических агентов с помощью модульных нанотранспортеров с целью терапии рака: разработаны модульные нанотранспортеры – технологическая платформа (т.е. базовая технология, служащая основой для решения отдельных конкретных задач), позволяющая придавать клеточную специфичность и высокую эффективность целому ряду противоопухолевых агентов путем доставки их в клеточное ядро за счет использования естественных процессов внутриклеточного транспорта.

Б) По доставке биологически активных полипептидов: на основе модульных нанотранспортеров созданы проникающие в живую клетку антителомиметики, которые можно назвать «ныряющими антителами», способные влиять на функции молекул-мишеней, а также новый тип модульных нанотранспортеров, воздействующих на функционирование транскрипционных факторов как в клетках *in vitro*, так и *in vivo*. Мы полагаем, что разрабатываемый подход может стать прорывным направлением как в создании инструментов для изучения функционирования живых клеток, так и, возможно, для разработки терапевтических средств.

В) По доставке генетического материала с помощью полиплексов: показана преимущественная трансфекция полиплексами делящихся клеток, что должно учитываться при их возможном практическом применении; эффективность трансфекции полиплексами показана *in vitro* и *in vivo*.

В перспективе планируется расширение спектра доставляемых биологически активных агентов, в первую очередь – антителомиметиков (создание новых «ныряющих антител»), а также гуманизация МНТ для возможного системного их применения. Эти работы уже начаты [68, 69]. ●

Автор благодарен своим коллегам  
А.А. Розенкранцу, Ю.В. Храмову и А.В. Уласову  
за пожелания, сделанные в процессе подготовки  
рукописи.

Работа выполнена при финансовой  
поддержке Российского научного фонда  
(грант № 17-14-01304).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sobolev A.S. // Herald Russ. Acad. Sci. 2013. V. 83. № 4. P. 324–335.
- Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. // Progress Biophys. Mol. Biol. 2000. V. 73. № 1. P. 51–90.
- Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019. 1161 p.
- Baade I., Kehlenbach R.H. // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. V. 58. P. 1–7.
- Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis. / Ed. Devarajan P.V. et al. Cham: Springer, 2019. 560 p.
- Ferrati S., Streiff A.K., Srinivasan S., Alexander J.F., Bhargava N., Peters A.M., Song N.E., Tasciotti E., Godin B., Ferrari M., et al. // Intracellular Delivery. Fundamentals and Applications. / Ed. Prokop A. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. P. 3–56.
- Sobolev A.S. // Bioessays. 2008. V. 30. № 3. P. 278–287.
- Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., et al. // FASEB J. 2003. V. 17. № 9. P. 1121–1123.
- Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., Khramtsov Y.V., Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., et al. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 21. P. 10534–10540.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Curr. Pharm. Design. 2015. V. 21. № 9. P. 1227–1238.
- Sobolev A.S., Aliev R.A., Kalmykov S.N. // Russian Chem. Rev. 2016. V. 85. № 9. P. 1011–1032.
- Slastnikova T., Rosenkranz A.A., Morozova N., Vorontsova M., Petriev V., Lupanova T., Ulasov A., Zalutsky M., Yakubovskaya R., Sobolev A. // Internat. J. Nanomed. 2017. V. 12. P. 395–410.
- Sobolev A.S. // Encyclopedia of Cancer. / Ed. Schwab M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017. P. 2891–2894.
- Kamaletdinova T.R., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Tsvetkova A.D., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // Doklady Biochem. Biophys. 2018. V. 479. № 1. P. 95–97.
- Sobolev A.S. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 952.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Nucl. Med. Biol. 2020. V. 80. P. 45–56.
- Haddad J., Slika S., Mahfouz R. // Meta Gene. 2017. V. 11. P. 157–163.
- Xu M.J., Johnson D.E., Grandis J.R. // Cancer Metastasis Rev. 2017. V. 36. № 3. P. 463–473.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Internat. J. Nanomed. 2012. V. 7. P. 467–482.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Karmakova T.A., Vorontsova M.S., Morozova N.B., Petriev V.M., Abrosimov A.S., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Ulasov A.V., et al. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1331.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Sobolev A.S. // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. № 11. P. 1228–1237.
- Khramtsov Y.V., Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. // J. Controlled Release. 2008. V. 128. № 3. P. 241–247.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Ovechko S.A., Sobolev A.S. // Drug Design. Dev. Therapy. 2017. V. 11. P. 1315–1334.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // Doklady Biochem. Biophys. 2017. V. 473. № 1. P. 85–87.
- Khramtsov Y.V., Vlasova A.D., Vlasov A.V., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Ryzhykau Y.L., Kuklin A.I., Orekhov A.S., Eydlin I.B., Georgiev G.P., Gordeliy V.I., Sobolev A.S. // Acta Cryst. 2020. V. D76. № 12. P. 1270–1279.

26. Karyagina T.S., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 176.
27. Slastnikova T.A., Koumariou E., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. // *EJNMMI Res.* 2012. V. 2. № 1. P. 1–10.
28. Koumariou E., Slastnikova T.A., Pruszyński M., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. // *Nucl. Med. Biol.* 2014. V. 41. № 6. P. 441–449.
29. Ku A., Facca V.J., Cai Z., Reilly R.M. // *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 2019. V. 4. P. 1.
30. Vaidyanathan G., Zalutsky M.R. // *Curr. Radiopharm.* 2011. V. 4. № 4. P. 283–294.
31. Slastnikova T., Rosenkranz A., Lupanova T., Gulak P., Gnuchev N., Sobolev A. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2012. V. 446. № 1. P. 235–237.
32. Mironov A.F., Grin M.A., Pantushenko I.V., Ostroverkhov P.V., Ivanenkov Y.A., Filkov G.I., Plotnikova E.A., Karmakova T.A., Starovoitova A.V., Burmistrova N.V., et al. // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. № 24. P. 10220–10230.
33. Buchegger F., Perillo-Adamer F., Dupertuis Y.M., Delaloye A.B. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2006. V. 33. № 11. P. 1352–1363.
34. Baidoo K.E., Yong K., Brechbiel M.W. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 3. P. 530–537.
35. Chadwick K.H., Leenhouts H.P. // *Molecular Theory of Radiation Biology. Monographs on Theoretical and Applied Genetics.* V. 5 / Ed. Frankel R., et al. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. 377 p.
36. Kassis A.I. // *Rad. Protect. Dosimetry.* 2011. V. 143. № 2–4. P. 241–247.
37. Raghavan R., Howell R.W., Zalutsky M.R. // *Biomed. Phys. Engin. Express.* 2017. V. 3. P. 035005.
38. Falzone N., Lee B.Q., Able S., Malcolm J., Terry S., Alayed Y., Vallis K.A. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 2. P. 250–258.
39. Claesson A.K., Stenerlöv B., Jacobsson L., Elmroth K. // *Radiat. Res.* 2007. V. 167. № 3. P. 312–318.
40. Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // *Internat. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics.* 2008. V. 72. № 1. P. 193–200.
41. Howell R.W. // *Med. Phys.* 1992. V. 19. № 6. P. 1371–1383.
42. Balagurumorthy P., Xu X., Wang K., Adelstein S.J., Kassis A.I. // *Internat. J. Radiat. Biol.* 2012. V. 12. P. 998–1008.
43. Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Кармакова Т.А., Панкратов А.А., Андреева Т.Н., Плотникова Е.А., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Лупанова Т.Н., Соболев А.С. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2016. Т. 15. № 1. С. 20–21.
44. Vorontsova M.S., Morozova N.B., Karmakova T.A., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Petriev V.M., Smoryzanova O.A., Tischenko V.K., Yakubovskaya R.I., Kaprin A.D., et al. // *AIP Conf. Proc.* V. 1882. AIP Publ., 2017. P. 0200781-1-020078-1-4.
45. Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Кармакова Т.А., Тищенко В.К., Сморязанова О.А., Петриев В.М., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Лупанова Т.Н., Якубовская Р.И. и др. // *Исследования и практика в медицине.* 2017. Т. 4 (спецвыпуск). С. 37.
46. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Кармакова Т.А., Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Петриев В.М., Лупанова Т.Н., Храмцов Ю.В., Уласов А.В. и др. // *Исследования и практика в медицине.* 2018. Т. 5 (спецвыпуск 2). С. 266.
47. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. // *DNA Repair (Amst.).* 2016. V. 42. P. 63–71.
48. Bruning J.B., Shamoo Y. // *Structure.* 2004. V. 12. № 12. P. 2209–2219.
49. Liddle P., Lafon-Hughes L., Di Tomaso M.V., Reyes-Abalos A.L., Jara J., Cerda M., Hartel S., Folle G.A. // *Chromosome Res.* 2014. V. 22. № 4. P. 463–481.
50. Sobolev A.S., Ulasov A.V., Georgiev G.P., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Karyagina T.S. The development of new types of modular nanotransporters carrying biologically active macromolecules as a tool for selective adjustment of specified functions of living cells. RSF Grant #17-14-01304. 2019. URL: <https://rsf.ru/contests/search-projects/17-14-01304/> (Access date: 26.05.2020).
51. Cuadrado A., Rojo A.I., Wells G., Hayes J.D., Cousin S.P., Rumsey W.L., Attucks O.C., Franklin S., Levonen A.L., Kensler T.W., et al. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2019. V. 18. № 4. P. 295–317.
52. Sekhar K.R., Freeman M.L. // *Free Rad. Biol. Med.* 2015. V. 88 (Pt B). P. 268–274.
53. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2014. V. 39. № 4. P. 199–218.
54. van der Eb M.M., de Leeuw B., van der Eb A.J., Hoeber R.C. // *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews* / Ed. Springer C.J. Totowa: Humana Press, 2004. P. 479–490. doi: 10.1385/1-59259-429-8:479.
55. Liu T.C., Kirn D.H. // *Gene Therapy for Cancer* / Ed. Hunt K.K., et al. Totowa: Humana Press, 2007. P. 351–385.
56. Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *Russ. Chem. Bull.* 2015. V. 64. № 12. P. 2749–2755.
57. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Mol. Therapy.* 2011. V. 19. № 1. P. 103–112.
58. Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rodichenko N.S., Slastnikova T.A., Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., et al. // *J. Controlled Release.* 2012. V. 163. № 2. P. 211–219.
59. Panté N., Kann M. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. № 2. P. 425–434.
60. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *J. Controlled Release.* 2015. V. 215. P. 73–81.
61. Wong A.D., Ye M., Ulmschneider M.B., Searson P.C. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 5. P. e0123461.
62. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Bagrov D.V., Klinov D.V., Kedrov A.V., Chemeris N.K., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *J. Controlled Release.* 2016. V. 232. P. 20–28.
63. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 38. P. 10209–10216.
64. Durymanov M.O., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *Theranostics.* 2015. V. 5. № 9. P. 1007–1020.
65. Alekseenko I.V., Snezhko E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantsev E.P., Vinogradova T.V., Khramtsov Y.V., et al. // *J. Translat. Med.* 2015. V. 13. P. 78.
66. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 14. P. 7928–7933.
67. Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. // *Mol. Reprod. Dev.* 1999. V. 54. № 2. P. 112–120.
68. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2018. V. 479. № 1. P. 62–65.
69. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2017. V. 472. № 1. P. 81–83.

УДК 577.2

# DPF-домен как уникальная структурная единица в активации транскрипции, дифференцировке и онкотрансформации

Н. В. Сошникова<sup>1\*</sup>, А. А. Шейнов<sup>1</sup>, Е. В. Татарский<sup>1</sup>, С. Г. Георгиева<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: nsoshnikova@genebiology.ru; sonjag@molbiol.edu.ru

Поступила в редакцию 17.07.2020

Принята к печати 28.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11092

**РЕФЕРАТ** Домен DPF (double PHD finger) включает в себя два PHD-домена, организованные в тандем. Домены PHD в составе DPF образуют единую структуру, которая взаимодействует с модификацией N-концевого фрагмента гистона по другому принципу, чем одиночные домены PHD. На сегодняшний день известно несколько модификаций гистонов, с которыми взаимодействует DPF. К ним относятся ацетилирование H3K14, H3K9 и кротонилирование H3K14. Эти модификации находятся преимущественно в транскрипционно-активном хроматине. Белки, содержащие DPF, входят в состав двух классов белковых комплексов, коактиваторов транскрипции, участвующих в регуляции структуры хроматина. Это комплекс гистон-ацетилтрансферазы семейства MYST и комплекс SWI/SNF, осуществляющий ремоделирование хроматина. Домен DPF определяет специфичность взаимодействий этих комплексов с хроматином. Белки, содержащие DPF, играют важную роль в активации транскрипции ряда генов, экспрессирующихся в процессе развития организма, важных при дифференцировке и онкотрансформации клеток млекопитающих.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** DPF-домены, тандемные PHD-домены, гистон-ацетилтрансферазы MOZ и MORF, DPF1, DPF2, DPF3, PHF10, BAF, PBAF.

## ВВЕДЕНИЕ

DPF (Double PHD Finger)-домен относится к группе PHD-доменов, широко представленных у млекопитающих. У человека насчитывается порядка двухсот белков, содержащих PHD (plant homeodomain)-домен. Домены PHD организованы по принципу цинковых пальцев (Zn-fingers), они состоят из двух антипараллельных бета-листов и C-концевой альфа-спирали, которые стабилизируются двумя ионами цинка, координирующимися мотивом Cys4-His-Cys3 [1, 2]. Хотя первичная структура PHD-доменов довольно разнообразна, их вторичная структура, впервые описанная в 2000 году, является высококонсервативной [3].

PHD-домены содержатся преимущественно в белках, взаимодействующих с N-концевыми фрагментами гистонов, они представляют собой регуляторы экспрессии генов [4]. PHD связываются с N-концевыми частями гистона H3, имеющего различные модификации [5, 6].

Некоторые белки содержат только один PHD-домен, другие могут содержать несколько последо-

вательно расположенных PHD-доменов, которые функционируют независимо друг от друга или действуют сообща.

DPF-домен представляет собой тандемно расположенные PHD, организованные по принципу «голова к спине» (face-to-back). Два домена образуют единую структуру, которая взаимодействует с N-концевыми фрагментами гистонов по другим принципам, чем независимые PHD-домены. Наш обзор посвящен белкам, содержащим DPF-домены, их организации, молекулярным механизмам распознавания «хвостов» гистонов, влиянию на экспрессию генов, роли в развитии млекопитающих и в онкогенезе.

## БЕЛКИ И КОМПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ DPF-ДОМЕН

Белки, содержащие DPF-домен, являются в основном субъединицами больших белковых комплексов, определяющих и изменяющих эпигенетический статус хроматина [6]. Специфичность работы таких комплексов обеспечивается точным узнаванием эпигенетических модификаций хроматина, в основном модифицированных N-концевых фраг-

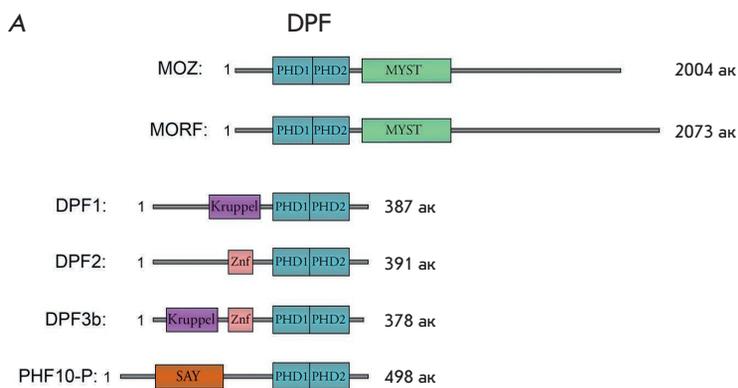
ментов гистонов. Многие субъединицы комплексов содержат различные домены, взаимодействующие с гистонами, например, Bromo-домен (белки TAF1, BAF180), Chromo-домен (белок CHD1), Tudor-домен (белок Uhrf1) и их комбинации. Каждый из доменов способен узнавать свою конкретную модификацию N-концевой последовательности гистона. Вместе, действуя комбинаторно, они увеличивают количество маркировок хроматина, которое распознается целым комплексом.

DPF-домен найден в двух группах белков, к одной из которых относятся гистон-лизин-ацетилтрансферазы MOZ и MORF, а к другой белки комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин (рис. 1А). Ацетилтрансферазы MOZ (другое название MYST3/КАТ6а) и MORF (MYST4/КАТ6b) являются паралогами. Они альтернативно входят в состав гистон-ацетилтрансферазного (НАТ) комплекса, семейства MYST, осуществляющего ацетилирование N-концов гистонов [7, 8] (рис. 1Б). Комплекс НАТ является коактиватором транскрипции, который локализуется в открытом, активно транскрибирующемся хроматине. MORF и MOZ содержат домен MYST, осуществляющий ацетилирование лизинов N-концевых последовательностей гистона H3 (H3K9, H3K14ac, H3K23). Комплекс НАТ MYST отвечает за создание гиперацетилированных участ-

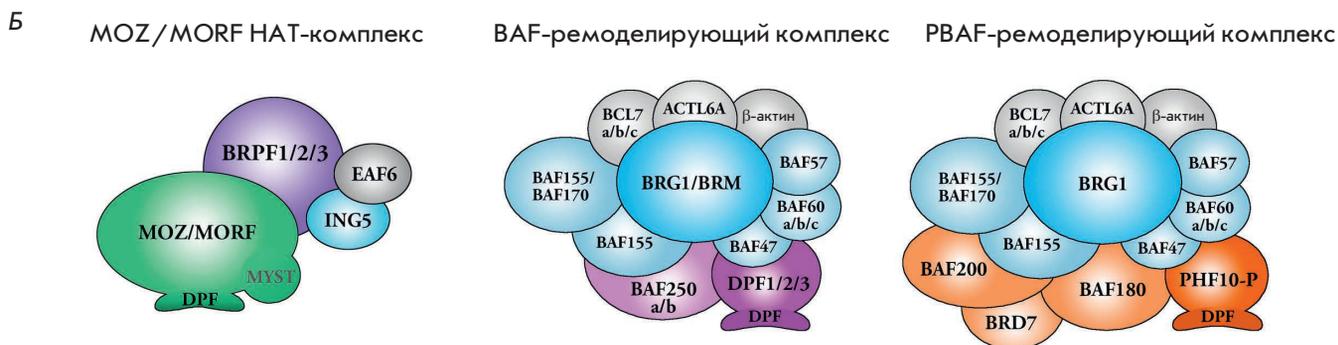
ков хроматина, что способствует активации соответствующих генов [8–10].

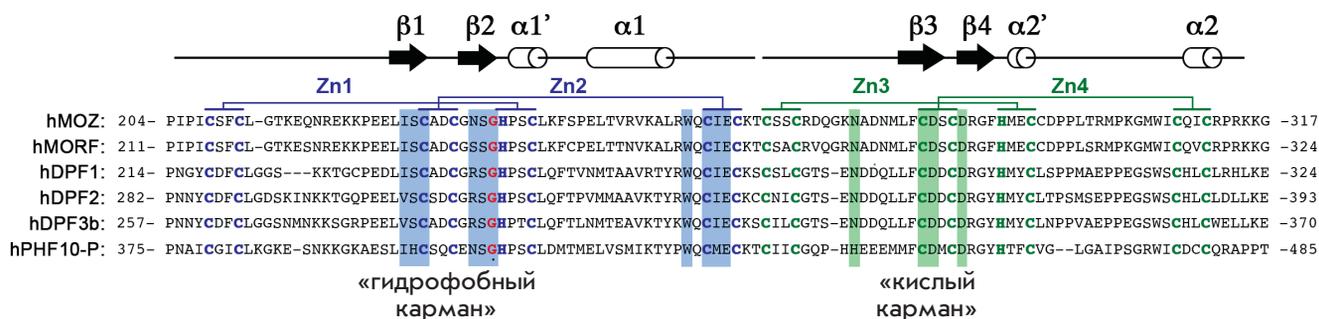
Другая группа белков, содержащих DPF, входит в состав комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин, его подсемейств BAF и PBAF (рис. 1Б). В эту группу входят белки DPF1 (другое название BAF45b), DPF2 (REQ или BAF45d), DPF3 (BAF45c), которые также называются белками семейства d4, и PHF10 (BAF45a) (рис. 1А). Комплекс SWI/SNF участвует в регуляции транскрипции генов, репарации и репликации. За счет АТФ-азной активности основной субъединицы BRG1 или ее гомолога BRM комплексы осуществляют смещение нуклеосом вдоль нити ДНК или перенос нуклеосомы на другую нить ДНК, удаление H2А и H2В или замену канонического гистона на его вариант [11].

Как сказано выше, SWI/SNF включает два типа комплексов: BAF и PBAF (рис. 1Б). Они имеют одинаковые белки основной (королевой) части, которые осуществляют смещение нуклеосом вдоль нити ДНК. При этом они отличаются белками специфических модулей, которые отвечают за взаимодействие с хроматином. Белки DPF входят в состав специфических модулей комплексов BAF и PBAF и участвуют в определении специфичности связывания комплекса с хроматином, в том числе за счет присутствующих в них доменов DPF.



**Рис. 1.** Схематичное изображение белков и комплексов, содержащих DPF-домены: А – доменная организация белков MOZ, MORF, DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10-P. DPF-домены выделены голубыми прямоугольниками. Б – схемы комплексов, содержащих соответствующие белки с DPF-доменами: гистон-ацетилтрансферазный комплекс (MYST), комплексы BAF и PBAF, ремоделирующие хроматин





**Рис. 2.** Выравнивание аминокислотных последовательностей DPF-доменов белков MOZ, MORF, DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10-P человека. Схематичное изображение вторичной структуры PHD1 и PHD2 изображено сверху последовательностей. Остатки цистеина и гистидина, координирующие ионы Zn, входящие в PHD1 и PHD2, указаны синим и зеленым соответственно. Гомологичные аминокислоты PHD1, образующие «гидрофобный карман» (hydrophobic pocket), связывающие H3K14ac/cr, подсвечены синим. Гомологичные аминокислоты, образующие «кислый карман» (acidic pocket), связывающие с первой по четвертую N-концевые аминокислоты гистона H3, подсвечены зеленым

**СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ УЗНАВАНИЯ ГИСТОНОВ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА DPF-ДОМЕНОВ**

DPF-домены белков MOZ, MORF, DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10 высокогомологичны, и ключевые аминокислоты, формирующие их вторичные структуры, одинаковы (рис. 2). Поэтому результаты изучения DPF каждого из этих белков с большой вероятностью будут верными и для DPF других белков этой группы.

Организация каждого из двух PHD-доменов белков MOZ, MORF, DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10 типична для доменов «цинковых пальцев» и представляет собой два антипараллельных бета-листа и следующую за ними альфа-спираль, которые координируются двумя атомами цинка через мотив Cys4-His-Cys3 (рис. 2). Однако, как показано для белка MOZ, два домена PHD ассоциированы друг с другом по типу «голова к спине» через взаимодействие E247 и R251 альфа-спирали первого PHD-домена, а также через взаимодействие S283 и R286 третьего и четвертого бета-листов второго PHD-домена.

Карбоксильная и карбонильная группы E247 образуют две водородные связи с двумя молекулами воды, которые взаимодействуют с карбоксильным и карбонильным водородом S283. Аналогичным образом R251 взаимодействует с азотом боковой цепи R286. Таким образом эти полярные взаимодействия позиционируют два PHD-домена, которые образуют уникальную глобулярную структуру [12]. DPF белков DPF2, DPF3b и DPF MORF также образуют подобную цельную структурную единицу [13, 14].

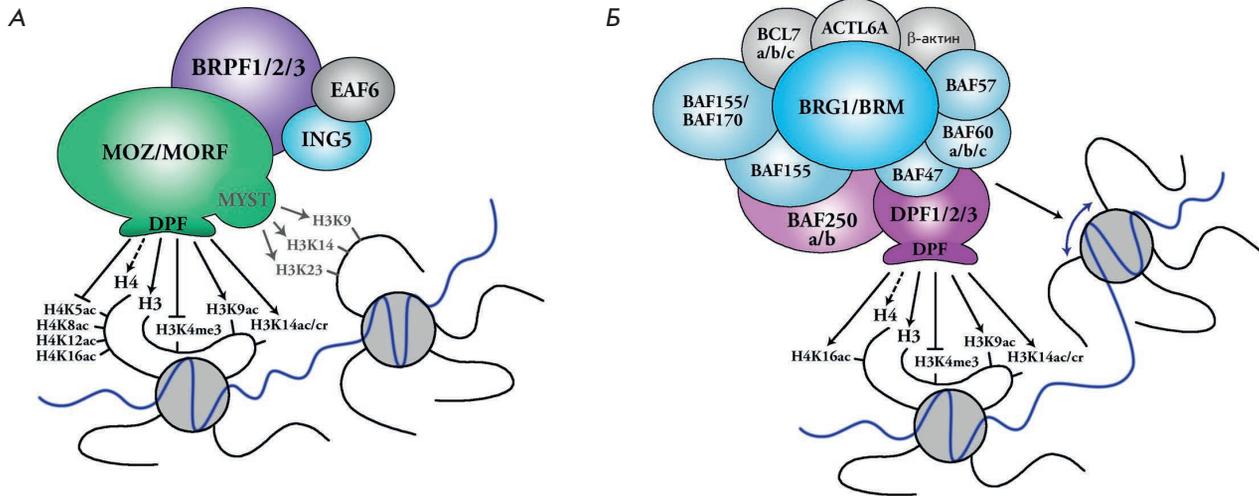
**DPF ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С АЦИЛИРОВАННЫМИ H3K14 И H3K9**

DPF-модули белков MOZ, MORF, DPF2 и DPF3b взаимодействуют с немодифицированными

N-концевыми фрагментами гистона H3. Ацетилирование H3K14 и H3K9 увеличивает константу связывания в 3 раза [12–15]. Метилирование H3K9me3 не влияет на связывание, а метилирование H3K4me3 жестко ингибирует связывание DPF с гистонами (рис. 3) [16]. DPF-домен этих белков также слабо взаимодействует с N-концом H4. Ацетилирование лизинов H4K5, H4K8, H4K12 или H4K16 приводит к прекращению взаимодействий между DPF-доменами MOZ и MORF и гистонам H4 (рис. 3) [16].

Чуть позже было показано, что DPF-домены белков MOZ и DPF2 способны взаимодействовать с кротонилированным остатком лизина 14 гистона H3, H3K14cr [17]. Кротонильный радикал имеет более гидрофобный боковой остаток и образует в пространстве плоскую структуру. Показано, что DPF-домены ацетилтрансферазы MORF взаимодействуют с другими ацильными группами – бутирилированным (H3K14bu), сукцинилированным (H3K14su) и 2-гидроксиизобутилированным H3K14 (H3K14hib), которые также имеют более длинные гидрофобные боковые цепи, чем ацетилированные модификации [18].

Молекулярный механизм взаимодействия между DPF и различными модификациями гистона H3 изучен с помощью кристаллических структур DPF-доменов с немодифицированными «хвостами» гистонов и с имеющими различные модификации H3K14ac/cr. Оба PHD-домена, образуя единую структурную единицу, связывают один N-концевой фрагмент гистона H3 с модификацией H3K14ac, cr или bu [12, 17, 18]. Из них модификацией, наиболее предпочтительной для связывания DPF-доменов MORF, является кротонильный радикал. DPF MORF связывается с H3K14cr в 3 раза сильнее, чем с H3K14ac [19]. Совсем недавно получены данные, согласно которым с ДНК взаимодействует небольшой



**Рис. 3.** Схематическое изображение активности комплексов HAT(MYST) (А) и BAF (Б), содержащих белки MOZ/MORF или DPF1–3. Показано взаимодействие с модификациями гистонов DPF-доменов (черные стрелочки), а также гистон-ацетилтрансферазная активность комплекса MYST (серые стрелочки) (А) и ремоделирующая активность комплекса BAF (синяя стрелочка) (Б)

участок DPF белка MORF в районе R306–K309. Эти взаимодействия усиливают связь MORF с нуклеосомой, которые определяются модификацией H3K14cr [19].

### МЕХАНИЗМ ПРОЧТЕНИЯ DPF-ДОМЕНОМ ПОСТТРАНЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ

Первый PHD-домен MOZ, MORF, DPF2 и DPF3b представляет собой уникальный домен группы «цинковые пальцы», который обладает гидрофобным карманом для связывания ацилированного лизина (рис. 2). Несмотря на то что ацилированный H3K14 занимает один и тот же карман внутри PHD1-домена белков MOZ и DPF3b, во взаимодействии DPF белков MOZ и DPF3b с H3K14 участвуют различные аминокислоты [16]. Однако гидрофобный карман в районе бета-2-листа первого PHD-домена является общей структурной особенностью, необходимой для связывания модификации H3K14ac, H3K14cr или H3K14bu [17, 18]. В случае белков MOZ и MORF гидрофобный карман образован аминокислотами N235–G237 бета-2-листа, I228–C230 бета-1-листа и аминокислотными остатками S210 (S217), F211 (F218), L242 (L249), W257 (W264), C259 (C266), I260 (I267) и E261, координирующими ион цинка (рис. 2).

G237 – важнейший для образования этого кармана аминокислотный остаток, который узнает ацетилированную и кротонилированную группы (рис. 2). Этот глицин присутствует в DPF-доменах белков MOZ, MORF, DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10, что указывает на способность DPF-доменов всех этих белков взаи-

модействовать с ацетилированным, кротонилированным или бутирилированным H3K4ac/cr/bu (рис. 2) [12, 17]. За различия во взаимодействии с H3K14cr и H3K14bu отвечает F211 (F218), который способен образовывать взаимодействия π–π между ароматическим кольцом фенилаланина и двойной связью C=C кротонильной группы [19].

Второй PHD-домен белков MOZ, MORF организован таким образом, что первые четыре остатка пептида H3K14ac/cr/bu связываются с «кислым» карманом в районе бета-1-листа этого PHD2-домена. При этом важно, чтобы аминокислоты R2 и K4 не были метилированы. Боковая цепь пептида H3R2 удерживается пятью водородными связями DPF-модуля белка MOZ с C281, D282 и D285, вместе с этим E261 и N274 образуют водородные связи с аминокислотной группой H3K4. В результате подобных пространственных ограничений R2 и K4 любое метилирование разрывает связь DPF с H3, а предпочтение в связывании получают ацетилированные лизины [12, 14, 17]. Появляется все больше экспериментальных данных о том, что второй PHD-домен белков d4 организован по тому же принципу и не узнает метилированный H3K4 [5].

Эти данные подтверждены экспериментами *in vivo*, в которых показано, что MOZ ассоциирован с хроматином, обогащенным H3K14A, и не связывается с хроматином, маркированным H3K4me3 [16]. На тех же самых генах *HoxA9*, *Hox7* и *HoxA5*, с которыми связывается ацетилтрансфераза MOZ, обнаружены кротонилированные метки H3K14cr [17]. Пока непонятно, как объяснить присутствие двух взаи-

моисключающих модификаций H3K14ac и H3K14cr на одних и тех же генах. Возможно, модификация H3K14 сильно зависит от активных метаболических путей в клетке, так как процент кротонилированных или бутирилированных гистонов напрямую связан с количеством соответствующей ацил-КоА, доступной для включения в метаболические пути [17, 20, 21]. Таким образом, НАТ вполне могут переключаться с одного субстрата на другой, чтобы изменять профиль модифицированных гистонов с ацилированных групп одного типа на другие.

### DPF-ДОМЕН В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Как уже сказано, DPF-домены связываются с ацилированным (ацетилированным, кротонилированным или бутирилированным) хвостом гистона H3 и являются так называемыми ридерами (readers), т.е. белками, узнающими данные модификации гистонов. Модификации H3K14ac и H3K9ac, с которыми взаимодействует DPF, характерны для транскрипционно-активного хроматина. Гистоны особо обогащенные этими модификациями находятся на промоторах и энхансерах генов [22, 23]. Модификация кротонилирования гистона H3, H3K14cr, также находится в транскрипционно-активном хроматине.

На примере гена *HOXA9* показан механизм регуляции транскрипции и эпигенетического состояния хроматина комплексами НАТ, в которые входят MOZ и MORF. Комплексы привлекаются на хроматин в результате взаимодействия с какими-либо транскрипционными активаторами, например RUNX или P53 [24, 25], или за счет взаимодействия других субъединиц с различными модификациями [26–28]. DPF-домены MOZ и MORF при этом способствуют локализации комплекса на участках с H3K14ac [12, 14], а ДНК-связывающие мотивы DPF способны стабилизировать эти взаимодействия с нуклеосомой [19]. Ацетилирование H3K14 осуществляет в основном гистон-ацетилтрансфераза HBO1, которая также содержит домен MYST [29], но это могут делать и белки MOZ/MORF [30]. Ацетилирование H3K23 и H3K9, как показано, осуществляется преимущественно с помощью MYST-домена белка MORF [31, 32] и может происходить либо на данной, либо на соседней нуклеосоме [19]. Ацетилирование соседней нуклеосомы способствует изменению локализации комплекса и его перемещению на эту соседнюю нуклеосому. Подобный механизм ведет к распространению гистоновых меток от одной нуклеосомы к другой, создавая гиперацетилированные участки хроматина. Привлечение комплекса НАТ на некоторые гены *HOX* (*HoxA9*, *HoxA7*, *HoxA5*, *HoxD13*) и образование гиперацетилированных участков на промоторах этих генов приводит к увеличению их экспрессии [12, 16,

17, 21]. Позже на полногеномном уровне при анализе базы ENCODE была выявлена колокализация модификаций H3K23ac и H3K14ac и обогащение ими промоторных участков генов с интенсивной транскрипцией в ряде клеточных линий IMR90, hESC, HME1 [19, 33].

Комплексы семейства SWI/SNF, в которые входит другая группа белков, содержащих домен DPF, более вариабельны по своему белковому составу, чем ацетилтрансферазные комплексы MYST. Комбинации различных субъединиц определяют специфичный состав комплекса, в котором уникальный паттерн доменов, связывающих ДНК или гистоны, позиционирует ремоделирующий комплекс в определенных сайтах хроматина. Комплексы VAF и PBAF привлекаются на определенные локусы транскрипционными активаторами и ремоделируют нуклеосомы: смещают их вдоль нитей ДНК, убирают гистоны H2A и H2B [34]. Ремоделирующими комплексами довольно сильно обогащены энхансеры, что также говорит в пользу участия ремоделирующих комплексов в активации транскрипции [35, 36].

Белки DPF1, DPF2, DPF3b и PHF10 тоже являются коактиваторами транскрипции. DPF3b и DPF3a связываются с активатором NF- $\kappa$ B и привлекаются вместе с ним в составе комплекса VAF на промотор *IL-6* в ответ на стимуляцию TNF-альфа [37]. Показано, что белок PHF10 в составе комплекса PBAF коактивирует транскрипцию различных генов [38, 39]. Получены прямые доказательства необходимости DPF-домена белка PHF10 для активации транскрипции, так как без DPF белок не способен активировать транскрипцию [38, 40]. Интересно, что в клетке также существует изоформа PHF10, не имеющая DPF-домена [39]. Показано, что изоформа с DPF-доменом участвует в активации транскрипции, тогда как изоформа без DPF необходима для поддержания стабильного уровня транскрипции после активации [40]. Таким образом, DPF-домен белка PHF10 является сильным коактиватором транскрипции.

### DPF В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК. ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ТКАНЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С момента открытия MOZ и MORF были ассоциированы с регуляцией клеточной пролиферации. На клеточной линии рака молочной железы MCF7 и эмбриональных фибробластах MEF мыши показано, что взаимодействие MOZ с PML и P53 ведет к ацетилированию P53 и последующей активации экспрессии белка p21. Ингибитор клеточного цикла p21 блокирует комплекс cyclinE/CDK2, который фосфорилирует ряд факторов, способствующих активации генов в чекпойнте G1/S клеточного цикла.

Не имея возможности запустить экспрессию генов для G1/S-перехода, клетки выходят из клеточного цикла и перестают делиться. Таким образом, MOZ и MORF ингибируют пролиферацию и реализуют последующий сценарий перехода клеток к старению [25, 41]. С другой стороны, MOZ поддерживает уровень экспрессии некоторых генов-репрессоров процесса старения в локусе INK4/ARF посредством ацетилирования H3K9ac [42, 43]. Как описано выше, MOZ и MORF регулируют экспрессию многих генов HOX, ответственных за развитие и дифференцировку организма, отчасти через взаимодействие с фактором BMI1, показанное генетически [44].

Показано, что MOZ играет важную роль в поддержании пула эмбриональных гемопоэтических стволовых клеток млекопитающих. Мыши с нокаутом этого гена погибали на эмбриональной стадии 14.5 дней, имея патологии печени и кроветворения [45]. Также показано, что ген MOZ необходим для нормального развития В-клеток крови и прогрессии лимфомы, индуцируемой с-МУС. MOZ взаимодействует с AML1 и PU.1 – двумя важными факторами гемопоэза, действует как их коактиватор, обеспечивая точную экспрессию соответствующих генов [46, 47].

Проведенные недавно полногеномные исследования больных с врожденными патологиями (тяжелые нарушения речи, гипотония и дисморфизм лица) выявили мутации в гене MOZ [48]. MORF принимает активное участие в развитии нервной и костной ткани. У мышей с минимальным количеством РНК (~10%) MORF наблюдалась карликовость, черепно-лицевые нарушения и церебральные дефекты [49]. MORF играет важную роль в регуляции нейрональных стволовых клеток, он необходим для поддержания нейрогенеза у взрослых мышей [50]. Таким образом, несмотря на то что MOZ и MORF способны замещать друг друга *in vitro*, они играют разную роль *in vivo*: MOZ важен для гемопоэза, а MORF – для нейрогенеза и остеогенеза.

DPF-белки комплексов SWI/SNF важны для нейрогенеза млекопитающих. DPF3b, входящий в состав ремоделирующего хроматин комплекса BAF, играет важную роль в дифференцировке мышечной и сердечной тканей [51]. PHF10 экспрессируется в предшественниках нервных клеток, начиная с ранних эмбриональных стадий, после рождения его экспрессия уменьшается. PHF10 способен поддерживать пролиферацию клеток-предшественников нейронов и в составе комплекса PBAF связывается с промоторами генов сигнальных путей, управляющих нейрональной пролиферацией и дифференцировкой: Notch, SHH, и разнообразными транскрипционными факторами. Остальные DPF (DPF1, 2, 3) начинают экспрессироваться на более поздних стадиях, начиная с E13

в головном мозге мыши и не способны поддерживать пролиферацию нервных клеток [38]. DPF1, вероятно, важен для функционирования взрослых нейронов, так как он тканеспецифически экспрессируется только в головном мозге взрослого млекопитающего. DPF2 также вовлечен в развитие и функционирование нервной системы. Однонуклеотидные замены, нарушающие последовательности DPF-доменов и приводившие к нарушению связывания DPF2 с ацетилированными H3, обнаружены у больных синдромом Коффин–Сириса (Coffin-Siris syndrome), проявляющемся в когнитивной дисфункции и интеллектуальных нарушениях разной степени тяжести, грубыми чертами лица, аномалиями головного мозга, например гипоплазией и агенезией мозолистого тела [52].

Показано, что белки DPF2 (комплекс BAF) и PHF10 (комплекс PBAF) экспрессируются в гемопоэтических клетках-предшественниках эмбрионов мыши E14.5 и регулируют их дифференцировку [53]. DPF2 ингибирует миелоидную дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников, его DPF-домен ответствен за привлечение DPF2 и всего комплекса BAF на специфические ацетилированные локусы хроматина – места связывания транскрипционного фактора RUNX1, который способствует дифференцировке предшественников по миелоидному ряду. Нокаут DPF2 в CD34<sup>+</sup> клетках приводит к уменьшению экспрессии генов, связанных с митозом, регуляцией клеточного цикла, и нарушает транскрипцию генов, связанных с дифференцировкой [15].

Гомозиготный нокаут PHF10 приводит к гибели мышечных эмбрионов (E19), но кондиционный нокаут в гемопоэтических клетках взрослой мыши вызывал существенное истощение миелоидных предшественников – гранулоцитов. Анализ РНК, выделенных из этих клеток, показал, что PHF10 существенно влияет на экспрессию генов клеточного цикла [53]. В исследовании, выполненном на модельной линии HL-60, способной дифференцироваться по миелоидному ряду, и на терминально дифференцированных нейтрофилах человека, установлено, что важную роль в поддержании пролиферирующих миелоидных предшественников играют изоформы PHF10 с доменом DPF, также необходимые для активации специфических миелоидных генов, экспрессия которых активируется при дифференцировке. В зрелых нейтрофилах транскрипцию специфических генов поддерживают изоформы PHF10, не имеющие DPF [40].

### **РОЛЬ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ DPF-ДОМЕНЫ, В ОНКОТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК**

В опухолевых клетках часто находят мутантные белки с DPF-доменом. Нарушения экспрессии белков

MOZ и MORF часто связаны с различными типами лейкоза. Участки хромосом, на которых расположены гены *MOZ* и *MORF*, подвергаются различным транслокациям, что приводит к формированию химерных белков [10]. Миелоидный лейкоз сопровождается транслокациями между генами *MOZ* и *CBP* [54], острый моноцитарный лейкоз ассоциирован с транслокациями между генами *MOZ* и *P300* [55], острый миелоидный лейкоз – с транслокациями между генами *MOZ* и *LEUTX* [56] и др. [57]. Ген *MORF* также способен к транслокации с образованием химерных белков. В результате транслокации образуется химерный белок MORF-CBP, ассоциированный с острым миелоидным лейкозом [58, 59]. Химерные белки, образующиеся в результате транслокаций, содержат на N-конце DPF-домены, что приводит к привлечению нового модификатора, активатора или регулятора в «старое» хроматиновое окружение, которое раньше занимала лишь ацетилтрансфераза семейства MYST.

Установлено, что MOZ необходим для поддержания прогрессирования лимфомы, индуцируемой онкогеном MYC [60], а недостаток этого белка ведет к развитию сценария старения нейрональных стволовых клеток [43]. Повышенная экспрессия MOZ способствует развитию глиобластомы и рака молочной железы [61–63].

Белки семейства d4 и RNF10 редко бывают мутированы в онкотрансформированных клетках [64, 65]. Однако снижение экспрессии белка DPF2 коррелировало с плохим прогнозом выживаемости пациентов с глиомой [66]. Показано также, что DPF2 способствует поддержанию пролиферации трансформированных MLL-AF9 миелоидных клеток-предшественников; при нокдауне DPF2 клетки начинали дифференцироваться, выходить из клеточного цикла и подвергались апоптозу [67].

Для белка DPF1 не было найдено сколько-нибудь значимых ассоциаций изменения его экспрессии с онкотрансформацией у больных раком.

Сниженная экспрессия RNF10 при раке почки коррелирует с повышенной выживаемостью пациентов [64, 66], что может быть связано с положительным влиянием онкогена *c-MYC* на экспрессию RNF10 [68].

DPF3 практически не экспрессируется в миелоидных предшественниках человека, однако под действием фактора STAT5 его экспрессия значительно возрастает в гранулоцитах больных хроническим лимфоцитарным лейкозом, что, по-видимому, может приводить к нарушениям регуляции транскрипции

и прогрессированию заболевания [69]. Пониженная экспрессия DPF3 ассоциирована также с плохим прогнозом по выживаемости больных раком молочной железы. Так, показано, что снижение экспрессии DPF3 приводило к активации сигнального пути JAK2/STAT3 и увеличению подвижности онкотрансформированных клеток [70].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реализация различных транскрипционных программ происходит при участии транскрипционных факторов – активаторов и репрессоров, и различных вспомогательных комплексов, меняющих структуру хроматина. Обычно эти комплексы состоят из большого числа субъединиц, которые содержат большое количество разнообразных доменов, связывающих ДНК и специфические хроматиновые метки – модифицированные хвосты гистонов. Благодаря этим доменам, комплексы позиционируются в строго определенном месте на хроматине и в дальнейшем дополнительно модифицируют его согласно своим активностям. DPF-домены образуют уникальную структуру, которая связывает хвост гистона H3, отдавая предпочтение модифицированному H3K14ac/cr. Гистоны H3 с ацетилированными и кротонилированными лизинами в основном локализуются в промоторных или энхансерных зонах транскрипционно-активного хроматина и, таким образом, служат маркерами привлечения комплексов NAT(MYST) и VAF/PBAF, в состав которых входят белки, содержащие DPF-домены. Количество белков, содержащих DPF, невелико, однако последовательности DPF в них гомологичны и имеют одинаковые аминокислоты в ключевых положениях, которые определяют связывание с H3K14ac/cr. Комплексы NAT(MYST) и VAF/PBAF соответственно ацетилируют другие хвосты гистонов и ремоделируют (перемещают) нуклеосомы, т.е. имеют коактиваторные функции и способствуют дополнительной активации транскрипции.

Таким образом, DPF-домены выполняют важную функцию связывания хроматина, приводящую к активации транскрипции генов, играющих большую роль в развитии организма. ●

*Данная работа поддержана грантом «Изучение субъединичного состава SWI/SNF-комплекса в процессе дифференцировки клеток млекопитающих и его роль в экспрессии генов», финансируемым Российским научным фондом (№ 18-14-00303).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kwan A.H.Y., Gell D.A., Verger A., Crossley M., Matthews J.M., Mackay J.P. // *Structure*. 2003. V. 11. № 7. P. 803–813.
2. Sanchez R., Zhou M.M. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. № 7. P. 364–372.
3. Pascual J., Martinez-Yamout M., Dyson H.J., Wright P.E. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 304. № 5. P. 723–729.
4. Musselman C.A., Kutateladze T.G. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 21. P. 9061–9071.
5. Jain K., Fraser C.S., Marunde M.R., Parker M.M., Sagum C., Burg J.M., Hall N., Popova I.K., Rodriguez K.L., Vaidya A., et al. // *Epigenetics Chromatin*. 2020. V. 13. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-0328-z>
6. Morrison E.A., Musselman C.A. *Chromatin Signaling and Diseases*. Elsevier Inc. 2016. P. 127–147. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802389-1.00007-1>
7. Ullah M., Pelletier N., Xiao L., Zhao S.P., Wang K., Degerny C., Tahmasebi S., Cayrou C., Doyon Y., Goh S.-L., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 22. P. 6828–6843.
8. Klein B.J., Lalonde M.E., Côté J., Yang X.J., Kutateladze T.G. // *Epigenetics*. 2014. V. 9. № 2. P. 186–193. doi: 10.4161/epi.26792.
9. Yang X.J. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2015. V. 1853. № 8. P. 1818–1826. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.014>
10. Huang F., Abmayr S.M., Workman J.L. // *Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 36. № 14. P. 1900–1907.
11. Wu J.I. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2012. V. 44. № 1. P. 54–69.
12. Qiu Y., Liu L., Zhao C., Han C., Li F., Zhang J., Wang Y., Li G., Mei Y., Wu M., et al. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 12. P. 1376–1391.
13. Zeng L., Zhang Q., Li S., Plotnikov A.N., Walsh M.J., Zhou M.M. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7303. P. 258–262.
14. Ali M., Yan K., Lalonde M.E., Degerny C., Rothbart S.B., Strahl B.D., Côté J., Yang X.J., Kutateladze T.G. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 424. № 5. P. 328–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.004>
15. Huber F.M., Greenblatt S.M., Davenport A.M., Martinez C., Xu Y., Vu L.P., Nimer S.D., Hoelz A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 23. P. 6016–6021.
16. Dreveny I., Deeves S.E., Fulton J., Yue B., Messmer M., Bhat-tacharya A., Collins H.M., Heery D.M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 822–835.
17. Xiong X., Panchenko T., Yang S., Zhao S., Yan P., Zhang W., Xie W., Li Y., Zhao Y., Allis C.D., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2016. V. 12. № 12. P. 1111–1118.
18. Klein B.J., Simithy J., Wang X., Ahn J.W., Andrews F.H., Zhang Y., Côté J., Shi X., Garcia B.A., Kutateladze T.G. // *Structure*. 2017. V. 25. № 4. P. 650–654.e2.
19. Klein B.J., Jang S.M., Lachance C., Mi W., Lyu J., Sakuraba S., Krajewski K., Wang W.W., Sidoli S., Liu J., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4724.
20. Sabari B.R., Tang Z., Huang H., Yong-Gonzalez V., Molina H., Kong H.E., Dai L., Shimada M., Cross J.R., Zhao Y., et al. // *Mol. Cell*. 2018. V. 69. № 3. P. 533. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.013>
21. Xie Z., Zhang D., Chung D., Tang Z., Huang H., Dai L., Qi S., Li J., Colak G., Chen Y., et al. // *Mol. Cell*. 2016. V. 62. № 2. P. 194–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.036>
22. Wan J., Liu H., Chu J., Zhang H. // *J. Cell. Mol. Med.* 2019. V. 23. № 11. P. 7163–7169.
23. Tan M., Luo H., Lee S., Jin F., Yang J.S., Montellier E., Buchou T., Cheng Z., Rousseaux S., Rajagopal N., et al. // *Cell*. 2011. V. 146. № 6. P. 1016–1028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
24. Pelletier N., Champagne N., Stifani S., Yang X.J. // *Oncogene*. 2002. V. 21. № 17. P. 2729–2740.
25. Rokudai S., Laptenko O., Arnal S.M., Taya Y., Kitabayashi I., Prives C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 10. P. 3895–3900.
26. Qin S., Jin L., Zhang J., Liu L., Ji P., Wu M., Wu J., Shi Y. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 42. P. 36944–36955.
27. Liu L., Qin S., Zhang J., Ji P., Shi Y., Wu J. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 180. № 1. P. 165–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2012.06.014>
28. Champagne K.S., Saksouk N., Peña P.V., Johnson K., Ullah M., Yang X.J., Côté J., Kutateladze T.G. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2008. V. 72. № 4. P. 1371–1376.
29. Lalonde M.E., Avvakumov N., Glass K.C., Joncas F.H., Saksouk N., Holliday M., Paquet E., Yan K., Tong Q., Klein B.J., et al. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 18. P. 2009–2024.
30. Kueh A.J., Dixon M.P., Voss A.K., Thomas T. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 4. P. 845–860.
31. Voss A.K., Collin C., Dixon M.P., Thomas T. // *Dev. Cell*. 2009. V. 17. № 5. P. 674–686. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.006>
32. Simó-Riudalbas L., Pérez-Salvia M., Setien F., Villanueva A., Moutinho C., Martínez-Cardús A., Moran S., Berdasco M., Gomez A., Vidal E., et al. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 18. P. 3936–3944.
33. Fiziev P., Akdemir K.C., Miller J.P., Keung E.Z., Samant N.S., Sharma S., Natale C.A., Terranova C.J., Maitituohti M., Amin S.B., et al. // *Cell Rep.* 2017. V. 19. № 4. P. 875–889. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.078>
34. Mittal P., Roberts C.W.M. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020. V. 17. P. 435–448. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0357-3>
35. Wang X., Lee R.S., Alver B.H., Haswell J.R., Wang S., Mieczkowski J., Drier Y., Gillespie S.M., Archer T.C., Wu J.N., et al. // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 2. P. 289–295. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3746>
36. Alver B.H., Kim K.H., Lu P., Wang X., Manchester H.E., Wang W., Haswell J.R., Park P.J., Roberts C.W.M. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14648. doi: 10.1038/ncomms14648
37. Ishizaka A., Mizutani T., Kobayashi K., Tando T., Sakurai K., Fujiwara T., Iba H. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 15. P. 11924–11933.
38. Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staahl B.T., Wu H., Aebersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. // *Neuron*. 2007. V. 55. № 2. P. 201–215.
39. Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. № 12. P. 1970–1979.
40. Viryasova G.M., Tatarskiy V.V., Sheynov A.A., Tatarskiy E.V., Sud'ina G.F., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. // *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 2019. V. 1866. № 12. P. 118525. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118525
41. Rokudai S., Aikawa Y., Tagata Y., Tsuchida N., Taya Y., Kitabayashi I. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 1. P. 237–244.
42. Sheikh B.N., Phipson B., El-Saafin F., Vanyai H.K., Downer N.L., Bird M.J., Kueh A.J., May R.E., Smyth G.K., Voss A.K., et al. // *Oncogene*. 2015. V. 34. № 47. P. 5807–5820.
43. Perez-Campo F.M., Costa G., Lie-A-Ling M., Stifani S., Kouskoff V., Lacaud G. // *Stem Cells*. 2014. V. 32. № 6. P. 1591–1601.
44. Sheikh B.N., Downer N.L., Phipson B., Vanyai H.K., Kueh A.J., McCarthy D.J., Smyth G.K., Thomas T., Voss A.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 17. P. 5437–5442.
45. Katsumoto T., Aikawa Y., Iwama A., Ueda S., Ichikawa H., Ochiya T., Kitabayashi I. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 10. P. 1321–1330.

46. Thomas T., Corcoran L.M., Gugasyan R., Dixon M.P., Brodnicki T., Nutt S.L., Metcalf D., Voss A.K. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 9. P. 1175–1186.
47. Sheikh B.N., Yang Y., Schreuder J., Nilsson S.K., Bilardi R., Carotta S., McRae H.M., Metcalf D., Voss A.K., Thomas T. // *Blood.* 2016. V. 128. № 19. P. 2307–2318.
48. Millan F., Cho M.T., Retterer K., Monaghan K.G., Bai R., Vitazka P., Everman D.B., Smith B., Angle B., Roberts V., et al. // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2016. V. 170. № 7. P. 1791–1798.
49. Thomas T., Voss A.K., Chowdhury K., Gruss P. // *Development.* 2000. V. 127. № 12. P. 2537–2548.
50. Merson T.D., Dixon M.P., Collin C., Rietze R.L., Bartlett P.F., Thomas T., Voss A.K. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 44. P. 11359–11370.
51. Lange M., Kaynak B., Forster U.B., Tönjes M., Fischer J.J., Grimm C., Schlesinger J., Just S., Dunkel I., Krueger T., et al. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 17. P. 2370–2384.
52. Vasileiou G., Vergarajauregui S., Endeles S., Popp B., Büttner C., Ekici A.B., Gerard M., Bramswig N.C., Albrecht B., Clayton-Smith J., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 102. № 3. P. 468–479.
53. Krasteva V., Crabtree G.R., Lessard J.A. // *Exp. Hematol.* 2017. V. 48. P. 58–71.e15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2016.11.008>
54. Borrow J., Stanton V.P., Andresen J.M., Becher R., Behm F.G., Chaganti R.S.K., Civin C.I., Distech C., Dubé I., Frischauf A.M., et al. // *Nat. Genet.* 1996. V. 14. № 1. P. 33–41.
55. Chaffanet M., Gressin L., Preudhomme C., Soenen-Cornu V., Birnbaum D., Pébusque M.J. // *Genes Chromosom. Cancer.* 2000. V. 28. № 2. P. 138–144.
56. Chinen Y., Taki T., Tsutsumi Y., Kobayashi S., Matsumoto Y., Sakamoto N., Kuroda J., Horiike Sh., Nishida K., Ohno H., et al. // *Genes. Chromosomes Cancer.* 2014. V. 53. P. 299–308.
57. Liang J., Prouty L., Williams B.J., Dayton M.A., Blanchard K.L. // *Blood.* 1998. V. 92. № 6. P. 2118–2122.
58. Panagopoulos I. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 4. P. 395–404.
59. Kojima K., Kaneda K., Yoshida C., Dansako H., Fujii N., Yano T., Shinagawa K., Yasukawa M., Fujita S., Tanimoto M. // *Br. J. Haematol.* 2003. V. 120. № 2. P. 271–273.
60. Sheikh B.N., Lee S.C.W., El-Saafin F., Vanyai H.K., Hu Y., Pang S.H.M., Grabow S., Strasser A., Nutt S.L., Alexander W.S., et al. // *Blood.* 2015. V. 125. № 12. P. 1910–1921.
61. Lv D., Jia F., Hou Y., Sang Y., Alvarez A.A., Zhang W., Gao W.Q., Hu B., Cheng S.Y., Ge J., et al. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 22. P. 6190–6201.
62. Tsai W.W., Wang Z., Yiu T.T., Akdemir K.C., Xia W., Winter S., Tsai C.Y., Shi X., Schwarzer D., Plunkett W., et al. // *Nature.* 2010. V. 468. № 7326. P. 927–932.
63. Yu L., Liang Y., Cao X., Wang X., Gao H., Lin S.Y., Schiff R., Wang X.S., Li K. // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 20. P. 2910–2918.
64. Kadoch C., Hargreaves D.C., Hodges C., Elias L., Ho L., J.R. & G.R.C. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 6. P. 592–602. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2628>
65. Masliah-Planchon J., Bièche I., Guinebretière J.-M., Bourdeaut F., Delattre O. // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2015. V. 10. № 1. P. 145–171. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012414-040445>
66. Savas S., Skardasi G. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. V. 123. № 11. P. 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.009>
67. Cruickshank A.V., Sroczyńska P., Sankar A., Miyagi S., Rundsten C.F., Johansen J.V., Helin K. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 11. P. 1–13.
68. Tatarskiy E.V., Georgiev G.P., Soshnikova N.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 484. № 1. P. 66–68.
69. Theodorou M., Speletas M., Mamara A., Papachristopoulou G., Lazou V., Scorilas A., Katsantoni E. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e76155.
70. Lin W. Hao, Dai W. Gang, Xu X. Dong, Yu Q. Hua, Zhang B., Li J., Li H. Ping. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 514. № 3. P. 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.170>

УДК 577.214.6

# Белки групп Polycomb и Trithorax: долгий путь от мутации у дрозофилы до применения в медицине

Д. А. Четверина<sup>\*</sup>, Д. В. Ломаев<sup>\*</sup>, М. М. Ерохин<sup>\*</sup>

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

<sup>\*</sup>E-mail: dchetverina@yandex.ru; lomaevdv@gmail.com; yermaxbio@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.07.2020

Принята к печати 30.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11090

**РЕФЕРАТ** Эволюционно консервативные белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG) отвечают за репрессию и активацию транскрипции множества генов у дрозофилы и млекопитающих. Нарушения экспрессии PcG/TrxG-генов связаны со многими патологическими состояниями, в том числе с онкологическими заболеваниями, что делает их подходящими мишенями для диагностики и терапии различных заболеваний. В данном обзоре рассмотрены основные комплексы белков PcG и TrxG, механизмы их действия и привлечения на хроматин. Мы обсуждаем нарушения, ассоциированные с дисфункцией ряда факторов данных групп при онкопатологиях, и подходы, используемые для создания лекарственных препаратов на основе низкомолекулярных веществ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** Polycomb, Trithorax, PRE, *Drosophila*, рак, ингибиторы PRC2, ингибиторы EZH2, низкомолекулярные ингибиторы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** PcG – Polycomb group (группа Polycomb); TrxG – Trithorax group (группа Trithorax); PRE – Polycomb Response Element (элементы ответа Polycomb).

## ВВЕДЕНИЕ

Для функционирования многоклеточных организмов необходимо установление и поддержание паттернов экспрессии генов, уникальных для каждого типа клеток. Контроль экспрессии генов на уровне транскрипции – один из ключевых этапов данной регуляции. Белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG) являются репрессорами и активаторами транскрипции соответственно [1–8]. Эти белки были впервые охарактеризованы у дрозофилы как регуляторы экспрессии генов *Hox*-кластера. *Hox*-гены отвечают за правильную сегментацию организма, а исходный профиль их экспрессии задается на ранней эмбриональной стадии развития белковыми продуктами генов *maternal*, *gap*, *pair-rule* и *segment polarity*, которые каскадно активируют друг друга [9–11]. Показано, что белки PcG/TrxG необходимы для последующего поддержания заданного профиля экспрессии [12, 13].

В 1947 году у дрозофилы была описана мутация *Polycomb*, при которой анатомические структуры, называемые «половыми щетинками» (Sex combs), в норме образующиеся только на первой паре ног у самцов, появлялись также на второй и третьей парах конечностей [14]. Было показано, что нарушение функций гена *Polycomb* приводит к трансформации

ряда сегментов [15] в результате сверхэкспрессии *Hox*-генов [12, 16, 17]. В частности, половые щетинки появляются в результате частичной трансформации второй и третьей пар ног в первую за счет депрессии гена *Scr* из комплекса *Antennapedia* [7]. Несколько позже открыли мутацию гена *trithorax*, фенотипические проявления которой (уменьшение числа половых щетинок) были противоположными фенотипу *Polycomb*-мутаций, что свидетельствует об инактивации *Hox*-генов [18, 19]. Впоследствии все мутации других генов, проявляющие себя сходным с *Polycomb* или с *trithorax* образом, стали классифицировать на группы PcG и TrxG соответственно [4, 7]. К данным группам также относятся гены, усиливающие мутантные фенотипы других охарактеризованных представителей в генетических тестах при скрещивании мутантных мух или нарушения экспрессии *Hox*-генов, определенные прямым анализом.

Эволюционно консервативные белки PcG/TrxG обнаружены у всех многоклеточных организмов. При этом у млекопитающих мутации в генах, кодирующих PcG/TrxG, также оказывают глобальное влияние на развитие организма [20, 21]. Кроме того, установлено, что область ответственности белков PcG/TrxG значительно шире регуляции генов

Нох-кластера и распространяется на сотни других мишеней как у дрозофилы, так и у млекопитающих. В частности, PcG/TrxG-факторы вовлечены в такие значимые биологические процессы, как канцерогенез, инактивация X-хромосомы млекопитающих, поддержание плюрипотентного статуса стволовых клеток [22–24].

В настоящем обзоре обсуждаются структура и функции комплексов PcG/TrxG, механизмы их действия и роль отдельных факторов в возникновении, диагностике и терапии онкологических заболеваний.

## КОМПЛЕКСЫ PcG И TrxG

### Комплексы группы PcG

Большая часть белков группы PcG ассоциирована в мультисубъединичные комплексы нескольких типов, основные из которых у дрозофилы и млекопитающих – PRC1 (Polycomb repressive complex 1), PRC2 (Polycomb repressive complex 2) и PR-DUB (Polycomb repressive deubiquitinase), а также PhoRC у дрозофилы (рис. 1).

У дрозофилы комплексы PRC2 содержат коровые компоненты E(z), Esc, Su(z)12 и Caf1 [25, 26]. Субъединица Esc имеет гомолога – Esc1, который может замещать его в составе комплекса [27]. Все субъединицы PRC2 дрозофилы имеют прямых гомологов у млекопитающих, однако есть только одна копия Esc – белок EED, и по две копии факторов E(z) и Caf1 – EZH2/EZH1 и RBBP7/RBBP4 соответственно. Белок Su(z)12 представлен одной копией одноименного белка – SUZ12 [28, 29]. Все коровые субъединицы PRC2 подтверждены как белки PcG у дрозофилы в генетических тестах [3, 4].

PRC2 моно-, ди- и триметилирует 27 лизин гистона H3 (H3K27me1/2/3) за счет активности SET-домена белка E(z) (EZH2/EZH1) [25, 26, 28, 29]. Модификация H3K27me3 является маркером участков хроматина, репрессированного системой PcG [30, 31]. Отсутствие модификации H3K27me3 при точечной замене 27 лизина гистона H3 на аргинин приводит к дерепрессии Нох-генов у дрозофилы [32].

EZH2 млекопитающих в системе *in vitro* обладает более высокой метилтрансферазной активностью, чем гомолог EZH1 [33]. Кроме того, EZH1 играет меньшую роль в развитии – мутантные по *EZH2*, *EED*, *SUZ12* эмбрионы мышей нежизнеспособны и гибнут в течение постимплантационного периода [34–36], в то время как мутанты *EZH1* жизнеспособны и фертильны [37]. В соответствии с этим, EZH2 и EZH1 имеют разный профиль экспрессии – транскрипция *EZH2* характерна для пролиферирующих клеток, а *EZH1* экспрессируется на разных стадиях развития примерно одинаково. В то же время EZH1 может

замещать EZH2 на более поздних стадиях развития или при повреждении EZH2 [33, 38, 39].

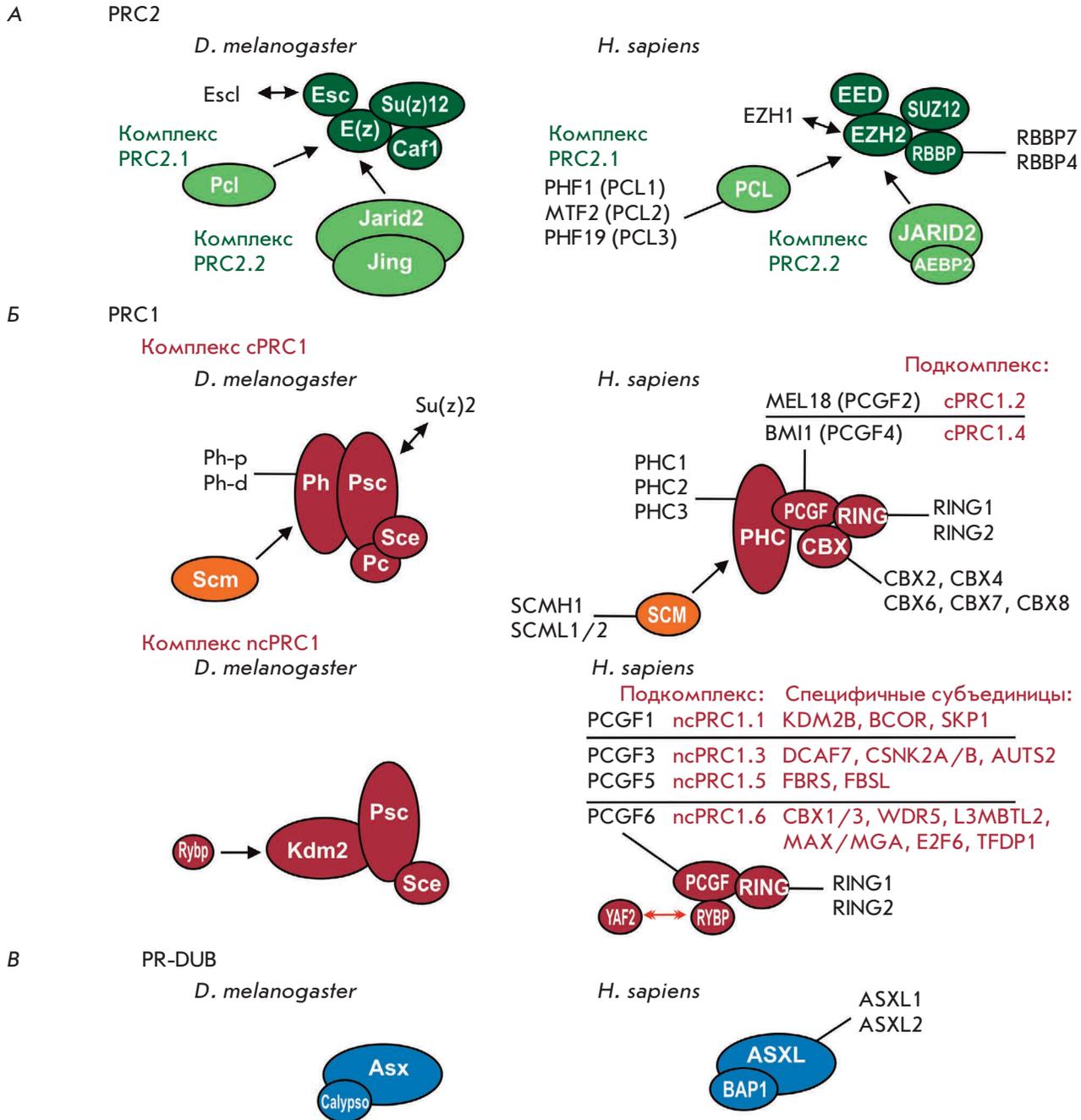
Для каталитической активности E(z)/EZH2 необходимы субъединицы Su(z)12/SUZ12 и Esc/EED [26, 36, 40–42]. При взаимодействии Esc/EED с H3K27me3 изменяется конформация всего комплекса PRC2 и стимулируется его метилтрансферазная активность [43]. В отличие от этого, субъединица Caf1 не нужна для метилтрансферазной активности E(z) [40–42].

У дрозофилы и млекопитающих коровый модуль PRC2 может взаимодействовать с дополнительными субъединицами. В настоящее время выделяют два комплекса: PRC2.1 и PRC2.2. Комплекс PRC2.1 включает белок Pcl (Polycomb-like) (у дрозофилы) и гомологичные белки – PHF1, PHF19 или MTF2 (у млекопитающих). Показано, что Pcl стимулирует метилтрансферазную активность E(z)/EZH2 [44, 45]. Комплекс PRC2.2 содержит субъединицы JARID2 и Jing/AEBP2 [46]. JARID2 специфично связывается с нуклеосомами, моноубиквитинированными по позиции H2AK118ub (H2AK119ub у млекопитающих). Белки Pcl, Jing, но не JARID2, подтверждены в генетических тестах как факторы PcG у дрозофилы [3, 4].

Комплексы PRC1 подразделяют на два типа – cPRC1 (канонический) и ncPRC1 (неканонический).

cPRC1 дрозофилы содержит коровые субъединицы Pc (Polycomb), Ph, Sce (также известный как dRing) и Psc [47–49]. В нестехиометрических количествах с cPRC1 соочищается гомолог Psc – фактор Su(z)2 [50, 51], он может замещать Psc в составе комплекса [52]. В состав комплекса ncPRC1 дрозофилы – dRAF (dRing Associated Factors) – входят белки Sce/dRing, Psc и Kdm2 [53]. Все субъединицы cPRC1 и ncPRC1 являются белками PcG у дрозофилы [3, 4].

Сходные комплексы присутствуют у млекопитающих, но Polycomb-факторы представлены множественными паралогами [54, 55]. cPRC1 млекопитающих включает гомологов одноименного комплекса дрозофилы: Pc (CBX2, 4, 6, 7, 8), Ph (PHC1–3), Sce (RING1/2), Psc (представлены в cPRC1 паралогами PCGF2 и PCGF4). В ncPRC млекопитающих наряду с RING1/2 и гомологами Psc (паралоги PCGF1, 3, 5 и 6) входит белок RYBP, который может замещаться белком YAF2. cPRC1 и ncPRC1 млекопитающих в зависимости от наличия определенного паралога Psc дополнительно подразделяются на подкомплексы cPRC1.1, cPRC1.2 и ncPRC1.3, ncPRC1.4, ncPRC1.5, ncPRC1.6 (рис. 1). Подкомплекс ncPRC1.1, который содержит специфичную субъединицу KDM2B (гомолог белка Kdm2), наиболее близок к комплексу dRAF дрозофилы. Одноименный гомолог RYBP обнаружен у дрозофилы [56, 57]. В экспериментах по коиммунопреципитации показано, что RYBP дрозофилы может соочищаться вместе



**Рис. 1.** Основные комплексы группы Polycomb. А – комплексы PRC2. Субъединицы дрозофилы показаны слева, а их ортологи млекопитающих справа. У дрозофилы и млекопитающих коровыми субъединицами PRC2 являются E(z)-Su(z)12-Esc-Caf1 и EZH2-SUZ12-EED-RBBP7/4 соответственно. Esc у дрозофилы может быть замещен белком-гомологом Escl; EZH2 млекопитающих – гомологом EZH1. Комплекс PRC2.1 содержит Pcl или PCL1/2/3; комплекс PRC2.2 содержит Jarid2/Jing или JARID2/AEBP2 у дрозофилы и человека соответственно. Б – комплексы PRC1. У дрозофилы и млекопитающих коровыми субъединицами PRC1 являются Sce-Psc и RING-PCGF соответственно. В cPRC1 коровые субъединицы ассоциируются с Pc-Ph у *Drosophila* или с их ортологами CBX-PHC у человека. В ncPRC1 коровые субъединицы связываются с Kdm2 у *Drosophila* и с субъединицей RYBP (или YAF2) у человека. У человека cPRC1 или ncPRC1 дополнительно подразделяются на подкомплексы по наличию специфической субъединицы PCGF (cPRC1.2, cPRC1.4, ncPRC1.1, ncPRC1.3, ncPRC1.5, ncPRC1.6). Другие специфические субъединицы указаны рядом с названием подкомплекса. В – PR-DUB-комплекс у дрозофилы и человека состоит из Asx-Calypso или ASXL1/2-BAP1 соответственно. Размеры фигур соответствуют размерам белковых молекул

с Sce и Kdm2, однако в генетических тестах он является бифункциональным и проявляет себя и как фактор Trithorax [57].

Каталитической субъединицей сPRC1 и ncPRC2 дрозофилы и млекопитающих является белок Sce/RING, который обладает E3-убиквитин-лигазной активностью и ответствен за модификацию H2AK118ub (H2AK119ub у млекопитающих). Как уже сказано, с данной модификацией взаимодействует JARID2 комплекса PRC2.2. Ферментативная активность dRING дрозофилы в составе комплекса dRAF выше, чем в комплексе сPRC1 [53]. Комплекс сPRC1 способен компактизировать хроматин и репрессировать транскрипцию [47, 49, 58–60], а Kdm2 (KDM2B) представляет собой гистондеметилазу, которая удаляет модификацию H3K36me2, характерную для активных районов хроматина [53, 61]. Кроме того, белок Pc (CBX) связывает нуклеосомы с модификацией H3K27me3, которая катализируется PRC2 [62–64].

С сPRC1 дрозофилы и млекопитающих соочищается белок Scm/SCMH1 [48, 49, 65], подтвержденный в тестах как фактор PcG [3]. Кроме того, Scm взаимодействует непосредственно с белком Ph [66, 67], однако, по крайней мере у дрозофилы, Scm считается субъединицей, независимой от сPRC1, так как может независимо рекрутироваться на хроматин [50, 68].

Комплекс PR-DUB (Polycomb repressive deubiquitinase) состоит из белков Calypso и Asx [69]. Calypso – это деубиквитирилаза, которая удаляет модификацию H2AK118/9ub, тогда как Asx стимулирует ферментативную активность Calypso [69]. Несмотря на функцию, противоположную функции комплексов PRC1, Calypso и Asx дрозофилы проявляют себя как факторы PcG. У млекопитающих имеются комплексы со схожей активностью: основу их составляет VAP1 (гомолог Calypso) и белки-гомологи ASXL1 (образует с VAP1 комплекс PR-DUB1), и ASXL2 (образует с VAP1 комплекс PR-DUB2) [54]. Значение одновременного присутствия убиквитириназы и деубиквитириназы, специфичных к одной и той же аминокислоте в гистоне H2A, в настоящее время не известно.

Комплекс PhoRC – ДНК-связывающий комплекс группы PcG, в состав которого входят Sfmbl и Pho [70]. Оба фактора являются белками PcG, и их мутанты характеризуются дерепрессией *Notch*-генов [70, 71]. Pho содержит ДНК-связывающий домен, состоящий из мотивов «цинковые пальцы» типа C2H2. Гомолог Pho – белок Phol, имеет такой же сайт связывания ДНК, как и Pho [72], и может вместо Pho взаимодействовать с Sfmbl [70]. У мутантов Phol, в отличие от Pho, нет гомеозисного фенотипа. Полногеномное распределение Pho и Phol отличается, и, если главные пики Pho перекрываются с белками PRC1

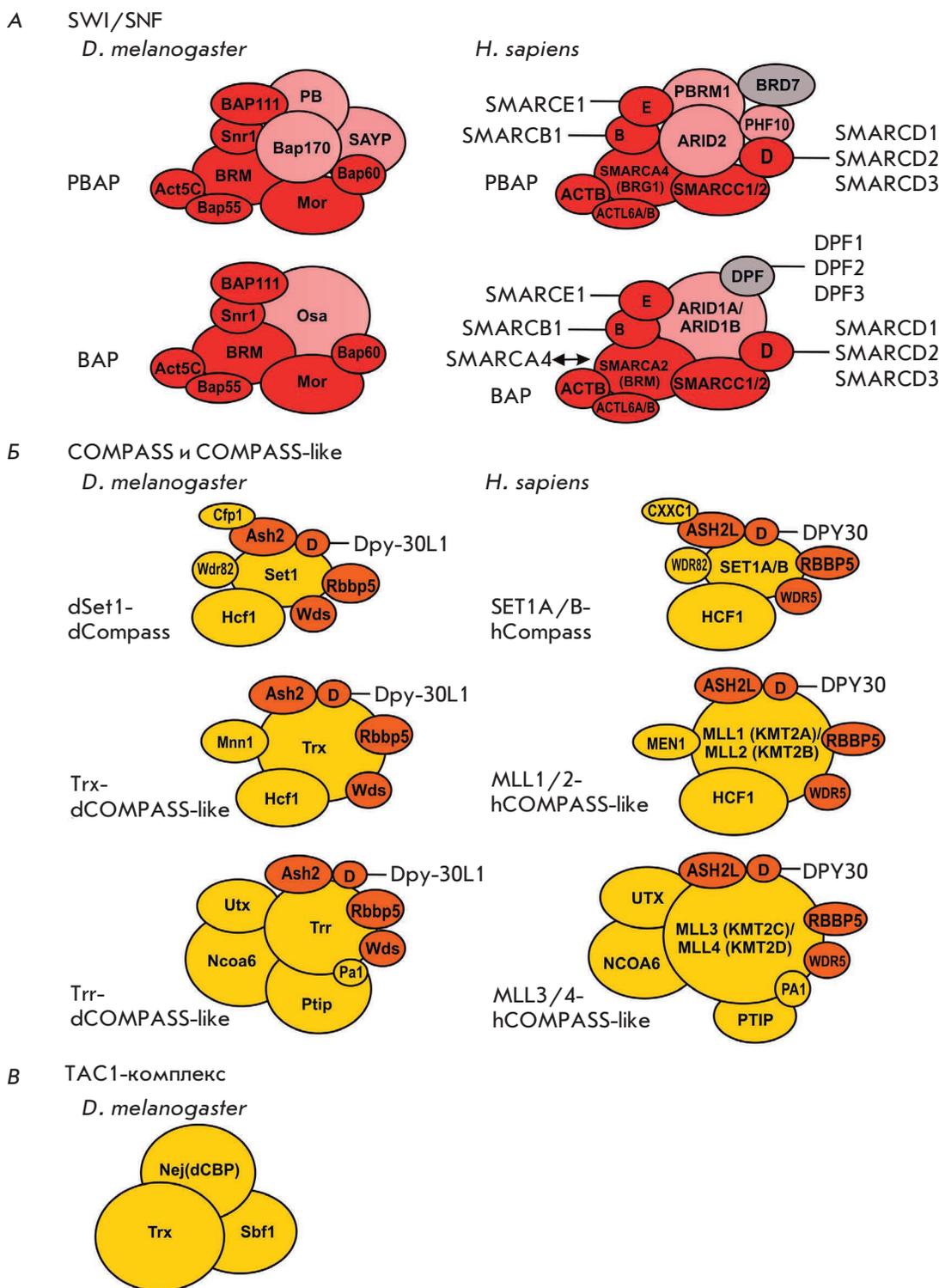
и PRC2, то Phol имеет тенденцию сильнее связываться с промоторами активных генов [73]. В то же время оба фактора принимают участие в рекрутировании белков PcG на хроматин (см. далее).

У млекопитающих есть прямые гомологи субъединиц комплекса PhoRC, однако попытки выделения этого комплекса на сегодняшний день не увенчались успехом. Гомологом Pho/Phol является белок YY1, гомологами Sfmbl – белки L3MBTL2, MBTD1, SFMBT1. При этом в белке YY1 сохраняется участок, необходимый для взаимодействия Pho с Sfmbl дрозофилы. В экспериментах *in vitro* показано, что эта область способна взаимодействовать с L3MBTL2, MBTD1 и SFMBT2, но сила такого взаимодействия в 50–100 раз ниже, чем при взаимодействии Pho-Sfmbl дрозофилы [74]. Это может объяснить тот факт, что при очистке комплекса L3MBTL2 методом коиммунопреципитации обогащение YY1 не выявлено [65, 75, 76]. Вместе с тем, YY1 у млекопитающих ассоциирован с RYBP (комплекс YY1-RYBP). Показано, что YY1-RYBP вовлечен как в репрессию, так и в активацию транскрипции большого числа генов [77, 78].

### Комплексы группы Trx

Группа факторов TrxG более гетерогенна, чем белки группы PcG, многие из которых вместе образуют многосубъединичные комплексы, участвующие в репрессии транскрипции. Генетически идентифицированные факторы TrxG входят в состав разных комплексов, участвующих в активации транскрипции [3, 4, 7, 8]. При описании комплексов мы указываем факторы TrxG, подтвержденные в генетических тестах у дрозофилы, т.е. мутации которых имеют фенотипические проявления, противоположные мутациям Polycomb.

Ряд факторов группы TrxG является субъединицами комплексов АТФ-зависимого ремоделирования хроматина (рис. 2). За счет энергии АТФ белки-ремоделеры изменяют структуру, сборку и расположение нуклеосом на ДНК, способствуя привлечению активаторных комплексов на хроматин [79]. Показано, что пять белков (Osa, Brm, Mor, Snr1, SAYP) дрозофилы, генетически проявляющие себя как Trithorax-факторы, входят в состав комплексов АТФ-зависимого ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF – VAP (Brahma-associated proteins)/PBAP (Polybromo-associated VAP) [80–83]. АТФ-аза Brm и белки Mor и Snr1 являются общими субъединицами обоих комплексов, в то время как Osa специфична для VAP, а белок SAYP – для PBAP-комплексов. Все эти TrxG-факторы имеют гомологов у млекопитающих и образуют сходные комплексы [79]. Белок Brm имеет двух гомологов – SMARCA2 и SMARCA4. В состав PBAP входит только SMARCA4, в комплек-



**Рис. 2.** Основные комплексы группы Trithorax. А – комплексы ВАР и РВАР семейства SWI/SNF. Субъединицы, общие для обоих комплексов, окрашены красным; специфические субъединицы ВАР или РВАР выделены розовым. Серым обозначены субъединицы человека, присутствие которых в составе комплексов ВАР/РВАР дрозофилы в настоящее время не подтверждено. Б – комплексы COMPASS и COMPASS-like. Субъединицы, общие для трех комплексов, окрашены в оранжевый цвет; специфические субъединицы – в желтый. В – комплекс TAC1 дрозофилы (не подтвержден у человека). Размеры фигур соответствуют размерам белковых молекул

се ВАР встречаются оба гомолога. Mor гомологичен белкам SMARCC1 и SMARCC2; Snr1 – SMARCB1. Гомологи факторов SAYP – PHF10; OSA – ARID1A и ARID1B, как и у дрозофилы, специфичны для РВАР и ВАР соответственно.

Белок Trithorax (Trx), давший название всей группе, является гистон-метилтрансферазой H3K4.

У дрозофилы известны два гомолога Trx – белки Trr (Trithorax-related) и Set1. Прямые гомологи этого белка у млекопитающих – Set1 (SET1A и SET1B), Trx (MLL1 и MLL 2) и Trr (MLL3 и MLL4) [21, 84, 85]. Показано, что все три фактора и их гомологи образуют сходные комплексы COMPASS и COMPASS-like. Все комплексы содержат общие субъединицы:

Ash2 (ASH2L), Dpy-30L1 (DPY30), Rbbp5 (RBBP5) и Wds (WDR5). У дрозофилы подтвержденным в генетических тестах TrxG-фактором является белок Ash2. Эти комплексы обеспечивают H3K4me1/2/3-специфичное метилирование нуклеосом, характерное для активных районов хроматина [8, 21, 86]. Согласно ряду публикаций, модификация H3K4me2 ассоциирована как с энхансерами, так и с промоторами генов; H3K4me3 ассоциирована с промоторами активно транскрибируемых генов, а H3K4me1 имеет большую специфичность к энхансерам [87]. Кроме того, модификации H3K4me1 и H3K4me2 у дрозофилы перекрываются с известными местами рекрутирования комплексов PcG на хроматин (PRE, см. далее) [88, 89]. Согласно имеющимся в настоящее время данным, белок Set1 отвечает за основную часть ди- и триметилирования H3K4 в клетках дрозофилы [90, 91], а основная функция белков Trx/Trr состоит в монометилировании H3K4 [89, 92]. Аналогично, MLL1/MLL2/MLL3/MLL4 млекопитающих метилируют H3K4me1 [89, 93]. Примечательно, что UTX, входящий в Trr (MLL3/MLL4) Compass-like, является H3K27me2/3-деметиلاзой [94–99].

Комплекс TAC1 включает факторы Trx, ацетилазу dCBP (известную также как Nejire) и белок Sbf1 [100]. У млекопитающих есть два гомолога белка Nej – P300 (EP300) и CBP (CREBBP), однако TAC1-подобный комплекс пока не охарактеризован. dCBP/P300/CREBBP обеспечивают модификацию активного хроматина H3K27Ac [101, 102]. Ацетилирование гистонов снижает силу взаимодействия нуклеосом с ДНК и приводит к декомпактизации хроматина [103]. Показано, что dCBP, Trx и Trr дрозофилы, а также создаваемые ими модификации H3K4me1 и H3K27Ac соответственно колокализуются на активных энхансерах и в областях рекрутирования белков PcG. При этом ацетилирование по позиции H3K27 *in vitro* усиливается в присутствии H3K4me1, Trr, Trx [89, 92, 101].

В число TrxG-факторов входит и белок Ash1, который, как и ASH1L, его гомолог у млекопитающих, метилирует лизин 36 гистона H3 (H3K36me2) [104–106], обладая активностью, противоположной активности Kdm2 (KDM2B). Кроме того, для эффективного метилирования H3K36 необходим TrxG-белок Kis [107], гомолог АТР-зависимых ремоделирующих хроматин белков подсемейства CHD млекопитающих [108].

К белкам группы Trithorax, проявляющим себя в генетических тестах, относится также Rad21 (RAD21 у млекопитающих) [109] – субъединица когезинового комплекса. Когезиновый комплекс стабилизирует дальние взаимодействия в ядре, в том числе энхансер-промоторные контакты, что необходимо для активации транскрипции [110, 111].

## МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СВЯЗЫВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ POLYCOMB И TRITHORAX С ХРОМАТИНОМ

### PRE-элементы в геноме дрозофилы

В геноме дрозофилы обнаружены специализированные ДНК-элементы, которые служат местами посадки белков PcG – PRE (Polycomb Response Elements) [3, 112–115]. PRE-элементы могут находиться как на удалении от гена-мишени (десятки и сотни тысяч пар нуклеотидов), так и в непосредственной близости от старта транскрипции (TSS).

Показано, что PRE – это элементы памяти репрессии, способные обеспечивать правильный профиль активности энхансера, заданный на ранних этапах эмбриогенеза. В составе трансгенных конструкций эмбриональные энхансеры, находящиеся вне геномного окружения (в отсутствие PRE-элементов), проявляют правильную сегмент-специфичную активность только на ранних этапах развития 0–6 ч, после чего происходит активация этих элементов и в других парасегментах, где они в норме не активны. Однако встроенный рядом PRE-элемент сохраняет правильный паттерн работы энхансера и на поздних этапах эмбриогенеза, ограничивая активацию генов в ненужных сегментах [116] (подробности в обзорах [3, 115]).

Показано, что PRE не обладает заданной специфичностью действия, и энхансер определяет область активности PRE. В ряде работ показано, что в присутствии активатора/энхансера активность PRE может быть либо переключена с репрессии на активацию, либо инактивирована. Двойственная природа PRE также хорошо прослеживается при создании серий трансгенных линий, несущих одну и ту же трансгенную конструкцию, встроенную в разные места генома. Оказалось, что активность PRE очень чувствительна к месту инсерции, и репрессия наблюдается только в половине получаемых линий. В остальных случаях PRE предположительно находится либо в нейтральном статусе, либо активирует транскрипцию. Кроме того, ряд эмбриональных энхансеров, контролирующих гены развития, обладает свойством PRE у взрослых особей [117], указывая на то, что, по крайней мере, ряд PRE в статусе активатора потенциально могут действовать как классические энхансеры. В соответствии с двойственной активностью PRE, данные элементы рекрутируют белки не только группы PcG, но и группы TrxG. При этом важно отметить, что белки PcG/TrxG могут рекрутироваться на ДНК PRE вне зависимости от статуса PRE [30, 118–120], что предполагает существование прямой конкуренции между системами PcG/TrxG в функционировании PRE. В соответствии с этим показано, что коровые субъединицы комплексов PcG могут быть ассоции-

рованы с районами активного хроматина и потенциальными энхансерами [121–125]. Предполагается, что белки PcG могут ограничивать излишнюю активность энхансеров и промоторов в данных областях.

### Рекрутирование белков PcG/TrxG на PRE-элементы

Установлено, что минимальным модулем PRE-элемента, необходимым для репрессии репортерных генов в составе трансгенов, является ДНК длиной несколько сотен пар нуклеотидов. К примеру, у Fab7PRE минимальный участок, достаточный для репрессии, равен 217 п.н., у enPRE – 181 п.н., у evePRE – 152 п.н. [126–128].

Коровые последовательности PRE-элементов содержат сайты связывания разных ДНК-связывающих факторов. Охарактеризованными ДНК-связывающими факторами PRE у дрозофилы являются белки Pho, Phol, GAF, Combgap, Spps, Zeste, Psq, Adf1, Grh, Dsp1 [112, 113]. Комбинация и взаимное расположение сайтов связывания этих белков различаются в разных PRE, что указывает на их неравнозначную роль в функционировании конкретного PRE. Показано, что 90% точек ассоциации PRC1/PRC2 в геноме связывают Pho и Combgap [129–132], половина (50%) пиков PRC1 взаимодействует с GAF и Dsp1 [132]. Аналогичное перекрытие с PRC1 белков Zeste и Phol составляет 25 и 21% соответственно [132].

Важно отметить, что большинство (если не все) ДНК-связывающие факторы, ассоциированные с PRE, участвуют как в репрессии, так и в активации транскрипции, и имеют в геноме и другие мишени, в том числе промоторы активных генов и потенциальные энхансеры [112, 113]. Кроме Pho, мутации генов, кодирующих белки этой группы, не обладают выраженным фенотипом PcG. Важно отметить, что сайты связывания одного ДНК-связывающего белка, в том числе и Pho, как и ряд комбинаций сайтов разных белков, не могут обеспечивать рекрутирование белков PcG. Это предполагает существование комбинаторной составляющей в функционировании PRE, при которой ДНК-связывающие белки образуют платформу для рекрутирования белков PcG [112].

Несмотря на то что протестированные комбинации сайтов ДНК-связывающих белков не рекрутируют факторы PcG, эти белки/или сайты их связывания проявляют себя как функционально значимые в различных трансгенных тест-системах [112]. Наиболее хорошо изучена роль Pho и его гомолога Phol в рекрутировании белков PcG. Показано, что ингибирование Pho с помощью РНК-интерференции (RNAi) в клеточной линии дрозофилы, которая не экспрессирует Phol, приводит к элиминации связывания Pc

(PRC1) и E(z), Su(z)12 (PRC2) с одним из хорошо охарактеризованных PRE (bxdPRE) [68, 133]. На стадии личинки, на которой экспрессируются оба гомолога, для потери связывания белков PcG необходима инактивация обоих факторов [133]. Установлено, что факторы Pho/Phol имеют прямые контакты с PRC1, PRC2. Так, Pho прямо взаимодействует с белками PRC2 (E(z), Esc) [133], PRC1 (Ph, Pc) [134], а Phol – с Esc [133]. Роль Pho/Phol в рекрутировании отличается для разных PRE. Так, при полногеномном исследовании показано, что, кроме Pho, важную роль в рекрутировании PcG-белков играют ДНК-связывающие факторы, Spps и Combgap [125, 135].

Кроме того, в соответствии с комбинаторным принципом функционирования PRE белки Spps, Dsp1, GAF и Grh могут способствовать взаимодействию Pho с PRE [125, 135–138].

Показано, что Grh может взаимодействовать непосредственно с Sce (PRC1) [139] и Pho [136]. Согласно результатам двутибридного скрининга, белок Spps прямо взаимодействует с Scm [140], который, в свою очередь, может взаимодействовать с белками Ph [66, 67] и Sfmbl [141, 142]. Эти взаимодействия могут стабилизировать связывание белков PcG с хроматином.

Кроме рекрутирования белков PcG, ДНК-связывающие факторы могут участвовать в привлечении белков TrxG на PRE. Показано, что Pho напрямую взаимодействуют с ATP-азой Brm [134], Zeste с MOR [143], а GAF необходим для рекрутирования Brm и Polybromo на bxdPRE [144].

Таким образом, ДНК-связывающие белки дрозофилы могут рекрутировать белки как группы PcG, так и Trx. Вероятно, общность ДНК-связывающих факторов систем PcG/TrxG повышает пластичность процессов регуляции транскрипции, способствуя, в случае необходимости, быстрому переключению с репрессии на активацию и наоборот.

### PRE-элементы млекопитающих

В геноме человека также описан ряд PRE-подобных элементов [145–149], а также несколько ДНК-связывающих белков, ассоциированных с системой PcG/TrxG. Среди них можно выделить факторы AEBP2, REST, SNAIL, RUNX1, E2F6, MGA/MAX [1].

В то же время необходимо отметить, что у млекопитающих, кроме сайт-специфичных ДНК-связывающих белков, большая роль в рекрутировании PRC2 принадлежит CpG-островкам (CGI) [150–152].

Вероятно, как и в случае генома дрозофилы, не существует какого-то универсального ДНК-связывающего рекрутера, ответственного за привлечение на хроматин всех многочисленных компонентов комплексов Polycomb/Trithorax.

Существование множества паралога белков PcG указывает на возможность большого разнообразия ДНК-связывающих факторов, что, учитывая их склонность к частичному взаимному замещению функций, создает проблемы для их идентификации. Мы предполагаем, что первостепенную роль в привлечении факторов PcG/TrxG на хроматин играют комбинации сайтов связывания отдельных ДНК-связывающих белков, которые формируют достаточно протяженные участки, необходимые для стабильного рекрутирования PcG/TrxG.

### Эпигенетические модификации

Ряд работ указывает на влияние модификаций нуклеосом на рекрутирование комплексов Polycomb/Trithorax. Метилтрансфераза E(z)/EZH2/EZH1 из комплекса PRC2 осуществляет модификацию H3K27me3, с которой взаимодействует белок Pc/CBX из комплекса PRC1. С другой стороны, компонент комплекса PRC1 – Sce/RING – осуществляет модификацию H2AK118/9ub, которую специфично узнает фактор JARID2, компонент комплекса PRC2. Найденные активности и взаимодействия предполагают существование положительных обратных связей, способствующих привлечению комплексов PRC1 и PRC2 на хроматин. Однако нарушение активности PRC2 не полностью элиминирует связывания компонентов PRC1 [153, 154], показывая, что модификации гистонов скорее усиливают сродство комплексов PcG с хроматином, нежели служат основным фактором привлечения. Также большой интерес вызывает роль модификации H2AK118/9ub. Показано, что нарушение убиквитиназной активности Sce/RING1 у дрозофилы и мышей не приводит к существенной потере Polycomb-зависимой репрессии [155, 156]. Однако необходимо отметить, что ситуация с взаимосвязанным рекрутированием PRC1 и PRC2 может зависеть от особенностей объекта исследований, так как недавно показано, что элиминация каталитической активности RING1 приводит к существенной потере связывания PRC2 в эмбриональных стволовых клетках мыши [157, 158]. При этом сильнее подавлялось связывание именно JARID2-содержащего комплекса PRC2.2, специфически связывающего модификацию H2AK199ub, в сравнении с вариантом PRC2.1, содержащим PCL.

### Некодирующие РНК

Длинные некодирующие РНК (днРНК) обнаружены во многих контролируемых репрессорами Polycomb локусах геномов млекопитающих. Кроме того, мутации генов системы Polycomb подавляли активности некоторых днРНК. Так, повреждение корового компонента комплекса PRC2 – белка EED – нарушало

активности днРНК Xist, вовлеченной в инактивацию одной из X-хромосом у млекопитающих [159], и днРНК, участвующих в геномном импринтинге [160]. Это привело к появлению гипотезы, согласно которой некодирующие РНК связывают PRC2 и рекрутируют данный комплекс на хроматин, являясь основополагающим этапом в привлечении Polycomb-репрессоров [161]. Однако впоследствии обнаружили, что PRC2 способен случайным образом связываться с различными РНК, включая короткие РНК, мРНК активно транскрибирующихся генов и даже бактериальные РНК [162–164].

Последние исследования показали, что с днРНК Xist может связываться неканонический комплекс PRC1, содержащий компоненты PCGF3/5 [165–167]. Такое взаимодействие опосредуется РНК-связывающим фактором hnRNPК, который эффективно узнает С-богатые мотивы в составе РНК [168]. Полученные данные предполагают более специфичное связывание PRC1-Xist в сравнении с PRC2-Xist (обсуждено в [169]). Однако не установлено, насколько такой механизм можно распространить на рекрутирование Polycomb-факторов в других участках генома млекопитающих.

Предпринимались также попытки выяснения потенциальной роли днРНК у дрозофилы, однако обнаружить стабильной ассоциации днРНК с PRC1 и PRC2 в настоящее время не удалось.

Подводя итоги, можно предположить, что большую роль в направленном рекрутировании Polycomb/Trithorax-факторов на хроматин у млекопитающих, как и у дрозофилы, играют ДНК-связывающие факторы, а именно специфичные комбинации их сайтов связывания. В настоящее время сведения о ДНК-связывающих факторах и их функциях, особенно в геноме млекопитающих, достаточно ограничены, и идентификация таких факторов является одной из важных задач ближайшего будущего [170]. Эпигенетические модификации гистонов (и ДНК у млекопитающих), так же как и РНК-белковые взаимодействия, могут играть большую роль в стабилизации взаимодействий между хроматином и факторами Polycomb/Trithorax. Однако специфический набор геномных мишеней определяется, по видимому, именно конкретными последовательностями ДНК и взаимодействующими с ними белками.

### МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ POLYCOMB/TRITHORAX

#### Конкуренция белков групп PcG и TrxG

Многие охарактеризованные активности белков группы TrxG функционально противоположны активностям белков группы PcG (рис. 3). Конкуренция

между белками PcG/TrxG может осуществляться как на PRE, энхансерах, так и на промоторах генов.

TrxG-активаторы обеспечивают метилирование H3K36me2 [104–106], деметилирование H3K27me3 [94–99], ацетилирование H3K27Ac [89, 101, 102].

PcG-репрессоры обеспечивают метилирование H3K27me3 [25, 26, 28, 29], деметилирование H3K36me2 [53, 61]. Кроме того, ряд работ свидетельствует в пользу того, что белки PcG могут функционировать совместно с гистондеацетилазой Rpd3/HDAC1, отвечающей за деацетилирование H3K27Ac [171–173].

Показано, что модификации гистонов активно-го хроматина ингибируют модификации PcG. Так, к примеру, метилирование гистонов H3K4me3 [174], H3K36me2/3 [106, 174], ацетилирование H3K27 [101] ингибируют метилирование H3K27me3.

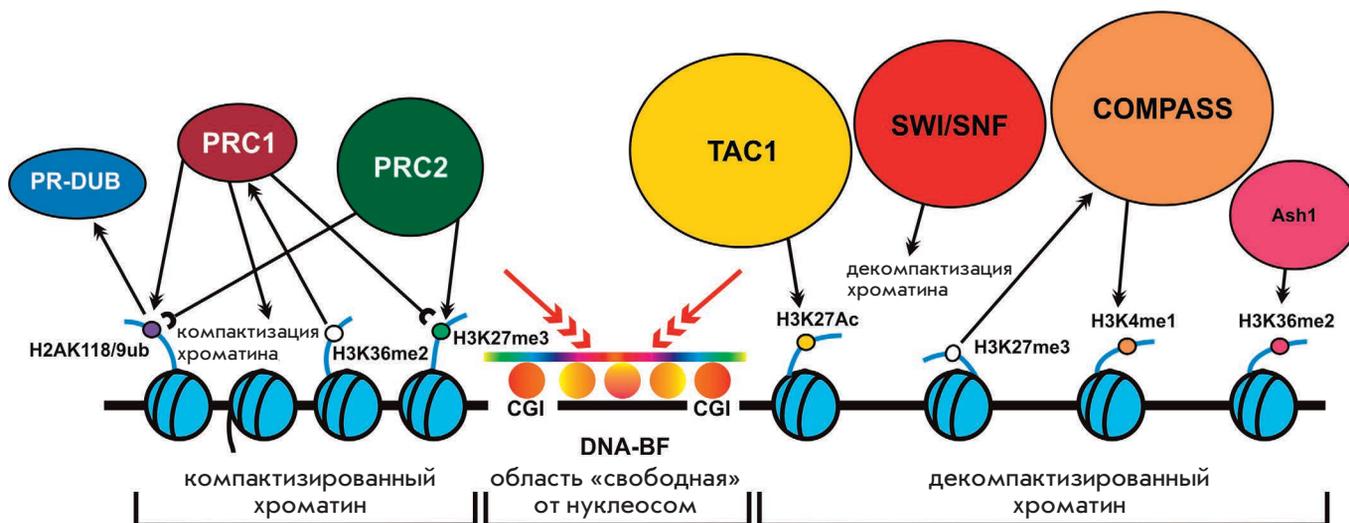
Конкуренция между белками PcG и TrxG также отражается и на уровне структуры хроматина. Если PRC1 способен компактизировать хроматин [58], то TrxG-комплексы VAP и PVAR, а также ацетилирование нуклеосом CBP способствуют декомпактизации хроматина [79, 103].

### Пространственные взаимодействия в активности системы PcG/TrxG

У многоклеточных организмов ядерная ДНК организована в высокоупорядоченные структуры нескольких уровней. На первом уровне ДНК упакована в нуклеосомы, которые, в свою очередь, собраны

в хроматиновые фибриллы. На более высоком уровне фибриллы образуют петлевые структуры, собранные в топологически ассоциированные домены (ТАД). Взаимодействия между ТАД приводят к образованию активных и неактивных хромосомных компартов, которые упорядочены в хромосомные территории [175–178]. При этом отдельные геномные локусы, расположенные на большом расстоянии друг от друга на одной хромосоме или даже находящиеся на разных хромосомах, могут физически взаимодействовать друг с другом.

Одни из первых свидетельств о значимости пространственных взаимодействий в активности PRE/TRE-элементов получены на трансгенных линиях дрозофилы, где наблюдался эффект усиления репрессии маркерного гена в случае особей, гомозиготных по трансгенной конструкции. В этом варианте трансгенные конструкции, расположенные в одних и тех же локусах на гомологичных хромосомах, взаимодействуют и усиливают активность друг друга (эффект получил название PSS (pairing sensitive silencing) [179, 180]). Кроме того, PRE-элементы способны репрессировать маркерные гены на больших дистанциях, и данная активность может быть заблокирована инсуляторами [181–183]. В этом аспекте поведение PRE/TRE напоминает активность энхансеров, также способных к дальним и сверхдальним взаимодействиям с промотором гена-мишени, что регулируется инсуляторными элементами [3, 184].



**Рис. 3.** Основные активности белков групп Polycomb/Trithorax. Комплекс PRC1 компактизирует хроматин, обуславливая модификацию H2AK118ub (у млекопитающих H2AK119ub), а также специфически связывается с нуклеосомами, метилированными по позиции H3K36me2. Комплекс PRC2 ответствен за модификацию гистонов H3K27me3 и взаимодействует с нуклеосомами H2AK118/9ub. Комплекс PR-DUB деубиквитинирует нуклеосомы по позиции H2AK118/9. Активаторные комплексы группы Trithorax декомпактизируют хроматин (SWI/SNF), ацетируют гистоны (TAC1) и обеспечивают метилирование H3K4 (COMPASS). ДНК-связывающие факторы (DNA-BF) и гипометилированные CpG-островки (CGI) участвуют в рекрутировании комплексов PcG/TrxG на хроматин

## НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ POLYCOMB/ TRITHORAX ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Нарушения активности факторов PcG/TrxG описаны при многих патологических состояниях, в том числе онкологических заболеваниях. Белки этих групп играют важную роль во многих клеточных процессах и могут выступать как онкосупрессоры либо как онкогены в зависимости от контекста опухоли и ткани. Показано, что нарушение хотя бы одной из субъединиц VAP/PVAP-комплексов встречается примерно в 25% случаев рака [185]. Обнаружена также существенная роль H3K4-специфичных метилтрансфераз из комплексов COMPASS и COMPASS-like в канцерогенезе [186, 187]. Активно изучается роль PcG-факторов из комплекса PRC1 в процессах канцерогенеза и возможность создания низкомолекулярных ингибиторов, блокирующих их активность [22, 188].

В данном обзоре мы сконцентрировались на описании нарушений функций комплекса PRC2 при онкологических заболеваниях. Проведенные в последнее десятилетие исследования показали большое распространение изменений активности EZH2 и его партнеров при онкологических заболеваниях, что привело к созданию ряда низкомолекулярных ингибиторов активности PRC2, первый из которых, таземетостат, одобрен к клиническому применению в медицинской практике в США в январе 2020 года [189–191].

### Нарушения активности комплекса PRC2 в канцерогенезе

На сегодняшний день известно, что к возникновению рака могут приводить как усиление, так и подавление активностей компонентов комплекса PRC2. В основном изменения детектируются в коровых компонентах PRC2 – белках EZH2, SUZ12 и EED [21, 23, 192–194]. Наибольшее количество полученных к настоящему времени данных относится к усилению функций PRC2, т.е. к ситуации, когда PRC2-кодирующие гены выступают в качестве онкогенов. Показано, что во многих видах злокачественных опухолей наблюдается сверхэкспрессия компонентов PRC2. Активация функции PRC2 может сопровождаться также мутациями приобретения функции (GOF, gain-of-function), которые приводят к усилению каталитической активности EZH2/EZH1. С другой стороны, описаны опухоли, в которых нарушения активности PRC2 связаны с повреждениями генов *EZH2*, *SUZ12* и *EED*, что предполагает онкосупрессорную роль PRC2 в данных случаях.

### Гиперфункции PRC2 при раке

**Повышенная экспрессия генов *EZH2*, *SUZ12* и *EED*.** Среди компонентов PRC2 наиболее существенно при канцерогенезе изменяется уровень транскрип-

ции гена *EZH2*. В нормальных клетках уровень транскрипции *EZH2* контролируется сигнальным путем RB-E2F, и высокий уровень экспрессии *EZH2*, характерный для активно делящихся клеток, существенно снижается при дифференцировке [33, 195, 196]. Однако во многих злокачественных новообразованиях наблюдается сверхэкспрессия *EZH2* [131, 195, 197–236] (рис. 4). Показано, что сверхэкспрессия *EZH2* сопряжена с повышенным уровнем H3K27me3, а также часто ассоциирована с амплификацией *EZH2*-кодирующего гена [195, 221, 226]. При этом в отдельных случаях установлена корреляция между высоким уровнем транскрипции *EZH2* и негативным прогнозом выживаемости пациентов [131, 197, 199, 202, 204, 206–209, 212–214, 218, 219, 222–225, 227–231, 236].

Сверхэкспрессия *SUZ12* и *EED* детектирована также при некоторых типах рака [202, 209, 211, 212, 214, 215, 217, 233, 237, 238], хотя клинических данных в настоящее время существенно меньше, чем в случае *EZH2*. В ряде исследований повышенный уровень транскрипции данных факторов связывают с негативным прогнозом выживаемости [202, 209, 212, 215, 233, 237].

**GOF-мутации *EZH2*.** Помимо повышенной экспрессии *EZH2*, *SUZ12* и *EED*, активность PRC2-комплекса может быть усилена GOF-мутациями в метилтрансферазном домене *EZH2*. Такие мутации описаны в определенном типе неходжкинских лимфом (диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL) и фолликулярные лимфомы) [129, 221, 239–245] (рис. 4). Наиболее часто встречаются точечные замены Y641→F,N,H,S относительно изоформы С (обозначается как Y646 относительно изоформы А) [129, 221, 239, 242–245]. Встречаются также функционально похожие мутации в позициях A677 и A687 [129, 221, 241, 243, 246, 247].

Показано, что мутантные формы *EZH2* более эффективно метилируют гистон H3 (H3K27me2), что приводит к повышенному уровню модификации H3K27me3. Таким образом, в лимфоидных опухолях с моноаллельными GOF-мутациями немутированный *EZH2* предпочтительно использует в качестве субстрата для метилирования H3K27me0/me1 нуклеосомы, тогда как мутантная форма обладает повышенной каталитической активностью в отношении H3K27me2 [248, 249]. Однако GOF-мутации *EZH2*, несмотря на их широкое распространение в лимфомах, не ассоциированы с негативными прогнозами выживаемости при фолликулярных лимфомах [239] и DLBCL [244].

GOF-мутации (Q571R) выявлены также в гомологе *EZH2* – факторе *EZH1*, в аденоме щитовидной железы [250]. Эта мутация приводит к увеличению количества H3K27me3.

	EZH2	SUZ12	EED	EZH2	EZH2	SUZ12	EED	ССЫЛКИ
Тип рака	Онкогенная функция PRC2			Онкосупрессорная функция PRC2				
	Гиперэкспрессия		GOF	LOF				
Рак мочевого пузыря	+НП	+НП						[195, 209, 228, 237]
Фолликулярная лимфома	+			+				[129, 221, 239, 242, 243, 245]
Диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL)				+				[242–245]
Мантйноклеточная лимфома	+НП	+						[206, 213, 217]
T/NK-клеточные лимфопролиферативные заболевания	+							[234]
Миелома	+НП							[223]
T-острый лимфобластный лейкоз					+	+	+	[262, 266]
Острый миелоидный лейкоз					+	+		[263]
МДС/МПЗ					+НП	+	+НП	[251, 253–255, 261, 264, 265, 268]
Глиобластома	+					+	+	[195, 232, 252]
Злокачественные опухоли оболочек периферических нервов						+	+	[252, 257, 267]
Рак молочной железы	+НП	+	+					[131, 195, 196, 201, 203, 208, 224, 225, 235]
Рак толстой и прямой кишки	+НП	+НП	+НП					[195, 215, 220, 228, 231]
Рак желудка	+НП	+НП						[195, 204, 222, 223]
Ретинобластома	+							[210]
Рак почки	+НП							[195, 230]
Рак гортани	+НП							[195, 236]
Гепатоцеллюлярная карцинома	+							[227]
Холангиокарцинома	+НП							[219]
Рак легких	+НП	+	+					[195, 199, 207, 214, 228, 238]
Рабдомиосаркома	+							[200]
Рак яичников	+НП	+НП	+					[211, 212, 216]
Рак предстательной железы	+НП	+НП						[131, 202, 226, 229, 232]
Меланома	+НП					+	+	[131, 195, 252]
Рак яичка	+							[195]
Рак щитовидной железы	+НП							[195, 198, 218]
Рак шейки матки, рак эндометрия	+НП					+		[131, 195, 197, 205, 256, 258, 259, 260]

**Рис. 4.** Нарушение активности коровых компонентов комплекса PRC2 в канцерогенезе. Обозначения: «+» на розовом фоне – случаи гиперактивации PRC2-комплекса, «+» на синем фоне – онкозаболевания, ассоциированные с потерей функции PRC2. «НП» – показано, что нарушение функции субъединицы PRC2 ассоциировано с негативным прогнозом выживаемости пациентов. МДС/МПЗ – миелодиспластический синдром/миелолиферативные заболевания

### Подавление активности PRC2 при раке

**LOF-мутации компонентов комплекса PRC2.** LOF-мутации (loss-of-function), нарушающие активность PRC2, описаны во всех трех коровых компонентах: EZH2, SUZ12 и EED [251–268] (рис. 4). Показано, что LOF-мутации EZH2 и EED ассоциированы с негативным прогнозом при миелодиспластическом син-

дроме/миелолиферативных заболеваниях [251, 253–255, 261, 265, 268].

Таким образом, наблюдаемая в ряде опухолей инактивация функций комплекса PRC2 и ее последствия изучены недостаточно, тогда как данных о гиперфункции PRC2 значительно больше. Дальнейшие исследования помогут более детально разобраться в значимости и частоте встречаемости LOF-мутаций PRC2-комплекса в разных типах опухолей.

**Мутации гистонов H3K27M.** Еще один тип мутаций, которые ограничивают активность PRC2, – точечные замены в генах *H3F3A* и *HIST1H3B* (кодируют варианты гистонов H3.3 и H3.1 соответственно). Такие мутации приводят к замене лизина в позиции 27 H3 на метионин (H3K27) и обозначаются как H3K27M. Установлено, что такие мутантные варианты гистонов взаимодействуют с EZH2 и ингибируют метилтрансферазную активность PRC2-комплекса, что приводит к снижению уровня H3K27me3 *in vivo* и *in vitro* [269–272]. Мутации H3K27M обнаружены в 80% детских глиом [273–275] и в 6% вторичных острых миелоидных лейкозов [276]. Недавно было показано, что EZH2 способен к автосметилированию по позициям EZH2-K510 и EZH2-K514. Такое автосметилирование стимулирует активность EZH2 в отношении гистонов и нарушается в линиях с мутацией H3K27M [277].

Описано также подавление активности PRC2 фактором EZHIP (EZH2 Inhibitory Protein), недавно открытым в клетках эндометрия (опухоль ЦНС) [278–281]. Предполагается, что участок EZHIP имитирует структуру H3K27M и сходным образом ингибирует активность PRC2.

### Механизмы онкогенного и онкосупрессорного влияния PRC2

Механизмы разнонаправленного действия PRC2 в разных видах опухолей в настоящее время активно изучают. В общем виде эти различия обусловлены тем, что в клетках одного типа PRC2 подавляет преимущественно экспрессию онкогенов, а в других – онкосупрессоров.

Показано, что сверхэкспрессия EZH2 усиливает клеточную пролиферацию как *in vitro* [195, 208], так и *in vivo* [282–284]. Повышенный уровень EZH2 стимулирует метастазирование [285], инвазию клеток [208] и влияет на репарацию ДНК [283]. GOF-мутации EZH2 усиливают MYC- и BCL-2-опосредованный лимфомогенез у мышей [282, 286]. Имеющиеся данные свидетельствуют, что онкогенное действие PRC2 заключается в подавлении транскрипции ряда онкосупрессоров, при этом конкретный набор ингибируемых онкосупрессоров сильно зависит от типа опухоли. Так, PRC2 подавляет транскрипцию *CDKN2A* в клетках рака предстательной железы и эндометрия, в лимфоидных новообразованиях (подробности см. в [192]). Необходимо отметить, что ингибирование активности PRC2 подавляет рост клеток ряда опухолей *in vitro* и *in vivo*, что привело к созданию низкомолекулярных ингибиторов (подробнее см. ниже).

Механизмы онкосупрессорного действия PRC2 на сегодняшний день описаны менее подробно, однако известно, например, что такие мишени PRC2,

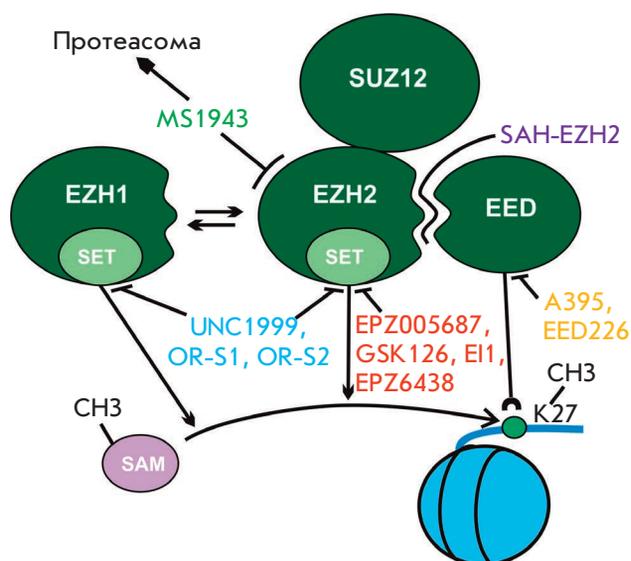
как онкогены *HOXA9* и *MYC*, сверхэкспрессируются во многих видах опухолей [252, 255, 262, 287]. У трансгенных мышей соматические делеции *EZH2* и *EED* взаимодействуют с мутацией онкогена *NRAS* (Q61K) и усиливают активацию сигнального пути STAT3, что приводит к формированию острых миелоидных лейкозов [288]. Комбинация мутаций генов *EZH2/RUNX1* и *EZH2/p53* приводит к образованию устойчивых к терапии миелоидных лимфолейкозов в мышиных моделях [289, 290]. Делеция *SUZ12* взаимодействует с мутацией фактора JAK3, что приводит к развитию острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза [291]. Инактивирующие мутации *EZH2* способствуют развитию миелодиспластического синдрома, индуцированного мутацией гена *RUNX1* [292]. Потеря активности *SUZ12* ассоциирована с мутацией гена *NF1* в опухолях периферической нервной системы, глиоме и меланоме [252]. *NF1* кодирует GTP-азу, активирующую ген *ras*, и мутации данного фактора приводят к Ras-зависимой активации канцерогенеза [293]. Потеря активности PRC2-комплекса наблюдается также при нарушениях в других генах, таких, как *ASXL1* [294], или при сверхэкспрессии фактора *HMG1* [295] при лейкозах.

Таким образом, в зависимости от мутаций или изменения экспрессии других генов, подавление функции PRC2 может приводить к злокачественной трансформации клеток [296, 297]. При этом канцерогенез может быть сопряжен с потерей функции всех трех коровых компонентов PRC2 – EZH2, SUZ12 или EED.

### Низкомолекулярные ингибиторы активности PRC2

Обнаружение многочисленных отклонений, связанных с гиперфункцией PRC2, позволило разработать низкомолекулярные ингибиторы, подавляющие активность данного комплекса (рис. 5).

Первым таким веществом стал DZNep. Этот ингибитор снижал уровень модификации H3K27me3 в культурах опухолевых клеток [298]. Однако затем выяснилось, что обработка клеток DZNep приводит к уменьшению общего уровня метилирования нуклеосом по разным позициям [299]. На следующем этапе были разработаны три ингибитора – EPZ005687 [300], GSK126 [301] и EI1 [302], которые специфично блокировали метилтрансферазную активность EZH2 как нативного белка, так и GOF-мутантной формы по позиции Y641. Принцип действия этих веществ основан на конкуренции с кофактором S-аденозилметионином (SAM) за селективное связывание с SET-доменом EZH2. Показано, что обработка культуры клеток ингибитором EI1 сравнима по эффекту с полной делецией гена *EZH2* при оценке уровня обогащения H3K27me3 [302]. Показана способность вещества GSK126 подавлять рост *in vivo*



**Рис. 5.** Схематическое представление механизма действия низкомолекулярных ингибиторов, подавляющих гиперактивность PRC2. **EPZ005687, GSK126, E11 и EPZ6438 (таземетостат)** направлены на SET-домен EZH2 и блокируют перенос метильной группы от S-аденозилметионина (SAM) к лизину в позиции H3K27. **UNC1999, OR-S1 и OR-S2** блокируют активность не только EZH2, но и его близкого гомолога EZH1. **SAH-EZH2** блокирует взаимодействие между EZH2 и EED, что приводит к дестабилизации PRC2-комплекса. **A395 и EED226** блокируют связывание белка EED с модификацией H3K27me3, которое стимулирует метилтрансферазную активность PRC2. **MS1943** узнает уникальную трехмерную структуру белка EZH2 и направляет его на путь протеасомной деградации

опухоли, полученной в результате ксенотрансплантации клеток линии KARPAS422 лимфомы человека мышам [301].

Ингибитор EZH2 – EPZ6438 (зарегистрированный позже под торговой маркой Таземетостат) также направлен на блокирование метилтрансферазного домена EZH2. Активность EPZ6438 показана на примере рабдоидных опухолей (malignant rhabdoid tumors (MRTs)), в которых поврежден ген *SMARCB1*, кодирующий один из компонентов хроматинремоделирующего комплекса SWI/SNF из группы Trithorax [303]. Нарушения функций данного гена часто встречаются в рабдоидных новообразованиях [304] и обуславливают высокую чувствительность клеток опухоли к подавлению активности PRC2 [305]. На примере ксенотрансформированных мышей показано, что обработка EPZ6438 приводит к уменьшению общего количества H3K27me3 и реактивации ряда репрессированных генов. Дальнейшие эксперименты также подтвердили активность EPZ6438 в подавлении пролиферации

опухолевых клеток, происходящих из лимфоидных новообразований [306].

Все описанные ингибиторы обладали высокой специфичностью в отношении EZH2 и гораздо меньшей активностью в отношении EZH1. Однако ранее показали, что EZH1 может замещать EZH2 при повреждении последнего. Таким образом, в ряде случаев при использовании высокоспецифичных ингибиторов, блокирующих активность EZH2, PRC2-комплекс может оставаться частично активным за счет работы EZH1. Поэтому в дальнейшем был разработан ряд ингибиторов, позволяющих решить эту проблему.

Ингибиторы UNC1999 [307], OR-S1 и OR-S2 [308, 309] направлены на подавление метилтрансферазной активности как EZH2, так и EZH1. На большой выборке линий опухолевых клеток проведен анализ подавления пролиферации клеток ингибитором OR-S2 [309]. Показано, что OR-S2 подавляет рост 33 из 68 линий опухолевых клеток гемопоэтического происхождения (лимфома, миелома, лейкоз) и 26 из 124 линий клеток солидных опухолей. Цитотоксические эффекты OR-S1 и OR-S2 подтверждены также на моделях рака желудка, рабдоидных опухолей и острого миелоидного лейкоза [308, 309].

Для поиска новых низкомолекулярных веществ, подавляющих активность PRC2, применяется также метод высокопродуктивного скрининга. Так, например, тестирование примерно 250 000 веществ позволило выявить 162, способных ингибировать EZH2 [310].

Благодаря определению пространственной структуры PRC2-комплекса появился еще один подход к разработке низкомолекулярных ингибиторов [43, 311, 312].

Во-первых, был синтезирован пептид (SAH-EZH2), имитирующий участок EED, необходимый для взаимодействия с EZH2 [313]. Обработка клеток SAH-EZH2 приводит к нарушению формирования комплекса PRC2, уменьшению количества H3K27me3 и ингибированию пролиферации злокачественных клеток крови и ретинобластомы [313, 314].

Во-вторых, в качестве мишени использовали область белка EED, которая специфично взаимодействует с модификацией H3K27me3 и важна для связывания PRC2 с хроматином. Разработаны два таких низкомолекулярных вещества – A395 и EED226, активность которых сходна с активностью ингибиторов метилтрансферазного домена EZH2 в отношении клеток лимфоидных новообразований [315, 316]. Необходимо отметить, что ингибитор A395 обладает цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, получивших устойчивость к ингибитору метилтрансферазного домена EZH2 – GSK126 [315]. Таким образом, комбинация ингибиторов, нацелен-

ных на разные области PRC2-комплекса, позволит избежать формирования устойчивости к химиотерапевтическим препаратам.

В-третьих, для подавления активности PRC2 используется метод «гидрофобного тагирования» (hydrophobic tagging, HyT). В этом случае создается химерная молекула, одна часть которой связывается с белком-мишенью, а вторая направляет связанный комплекс на путь протеасомной деградации [317]. С помощью этого метода разработан ингибитор MS1943, специфичный к EZH2 [318]. Показано, что MS1943 подавляет рост клеточной линии MDA-MB-468 тройного негативного рака молочной железы, устойчивой к ингибиторам метилтрансферазного домена EZH2. Так, ингибирование метилтрансферазной активности и деградация PRC2-комплекса могут вызывать разные терапевтические эффекты, что можно использовать в медицинской практике, применяя комбинации различных препаратов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента обнаружения мутации *Polycomb* прошло уже более 70 лет, и за это время достигнут огромный прогресс в изучении функционирования систем PcG/TrxG. В настоящее время становится ясной глобальная роль этих факторов в регуляции транскрипции и поддержании клеточного гомеостаза. Также растет массив данных, затрагивающих нарушения функций PcG/TrxG, при различного рода патологиях. Однако ряд вопросов, которые необходимо исследовать для более полного понимания работы данной системы, остается открытым. Не ясны детали привлечения комплексов PcG/TrxG в строго определенные участки генома. Какой вклад вносят в данные процессы различные механизмы – активность специфичных ДНК-связывающих факторов, эпигенетические метки, некодирующие РНК и, воз-

можно, другие, еще не обнаруженные биологические процессы. Усложнение системы PcG/TrxG в процессе эволюции от беспозвоночных к млекопитающим и появление множества паралога данных белков представляет большую проблему для исследователей. Насколько известные в настоящий момент белковые комплексы характерны для всех типов клеток? Или же они уникальны только для ряда тканей и/или стадий развития и отличны в других? Многочисленные работы последних лет отводят большую роль пространственной организации генов в ядре и, как показано, эти процессы тесно связаны с функционированием PcG/TrxG-комплексов. Остается установить, насколько такая организация определяет функции ДНК-регуляторных элементов, либо же она является следствием связывания транскрипционных комплексов с хроматином. Большая работа предстоит также в дальнейшем определении значимости PcG/TrxG-факторов в медицине, создании улучшенных низкомолекулярных ингибиторов и выработке оптимальных терапевтических протоколов. В то же время, несмотря на колоссальный прогресс в изучении PcG/TrxG-белков у млекопитающих, дрозофила до сих пор остается незаменимым модельным организмом для детализации механизмов регуляции транскрипции белками PcG/TrxG.

Развитие биологических методов (редактирование генома, высокопроизводительное секвенирование, масс-спектрометрические подходы) позволяет надеяться на получение ответа на многие обсуждавшиеся вопросы. Однако совершенно ясно, что долгий путь исследования факторов PcG/TrxG еще далек от своего завершения. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта  
РФФИ № 18-34-20046.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bauer M., Trupke J., Ringrose L. // *Chromosoma*. 2015. V. 125. P. 471–496.
- Brand M., Nakka K., Zhu J., Dilworth F.J. // *Cell Stem Cell*. 2019. V. 24. № 4. P. 518–533.
- Chetverina D.A., Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., Georgiev P.G., Erokhin M.M. // *Genetika*. 2017. V. 53. № 2. P. 133–154.
- Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. // *Genetics*. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725.
- Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2020. V. 89. P. 235–253.
- Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., Cavalli G. // *Cell*. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57.
- Kingston R.E., Tamkun J.W. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. V. 6. № 10. P. a019349.
- Schuettengruber B., Martinez A.M., Iovino N., Cavalli G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 12. № 12. P. 799–814.
- Pankratz M.J., Jackle H. // *Trends Genet.* 1990. V. 6. № 9. P. 287–292.
- Small S., Levine M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991. V. 1. № 2. P. 255–260.
- Akam M. // *Development*. 1987. V. 101. № 1. P. 1–22.
- McKeon J., Brock H.W. // *Roux Arch. Dev. Biol.* 1991. V. 199. № 7. P. 387–396.
- Struhl G., Akam M. // *EMBO J.* 1985. V. 4. № 12. P. 3259–3264.
- Lewis P.H. // *Dros. Inf. Serv.* 1947. V. 21. P. 69.
- Lewis E.B. // *Nature*. 1978. V. 276. № 5688. P. 565–570.
- Wedeen C., Harding K., Levine M. // *Cell*. 1986. V. 44. № 5. P. 739–748.
- Beuchle D., Struhl G., Muller J. // *Development*. 2001. V. 128. № 6. P. 993–1004.
- Ingham P.W. // *Wilehm. Roux. Arch. Dev. Biol.* 1981. V. 190. № 6. P. 365–369.
- Ingham P.W., Whittle J.R.S. // *Mol. Gen. Genet.* 1980. V. 179. P. 607–614.
- Laugesen A., Helin K. // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 6. P. 735–751.

21. Piunti A., Shilatifard A. // *Science*. 2016. V. 352. № 6290. P. aad9780.
22. Chan H.L., Morey L. // *Trends Biochem. Sci.* 2019. V. 44. № 8. P. 688–700.
23. Comet I., Riising E.M., Leblanc B., Helin K. // *Nat. Rev. Cancer*. 2016. V. 16. № 12. P. 803–810.
24. Brockdorff N. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017. V. 372. № 1733. P. 1–5.
25. Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V., Imhof A., Pirrotta V. // *Cell*. 2002. V. 111. № 2. P. 185–196.
26. Muller J., Hart C.M., Francis N.J., Vargas M.L., Sengupta A., Wild B., Miller E.L., O'Connor M.B., Kingston R.E., Simon J.A. // *Cell*. 2002. V. 111. № 2. P. 197–208.
27. Kurzhals R.L., Tie F., Stratton C.A., Harte P.J. // *Dev. Biol.* 2008. V. 313. № 1. P. 293–306.
28. Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. // *Science*. 2002. V. 298. № 5595. P. 1039–1043.
29. Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 22. P. 2893–2905.
30. Papp B., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 15. P. 2041–2054.
31. Schwartz Y.B., Kahn T.G., Nix D.A., Li X.Y., Bourgon R., Biggin M., Pirrotta V. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. № 6. P. 700–705.
32. Pengelly A.R., Copur O., Jackle H., Herzig A., Muller J. // *Science*. 2013. V. 339. № 6120. P. 698–699.
33. Margueron R., Li G., Sarma K., Blais A., Zavadij J., Woodcock C.L., Dynlacht B.D., Reinberg D. // *Mol. Cell*. 2008. V. 32. № 4. P. 503–518.
34. Faust C., Schumacher A., Holdener B., Magnuson T. // *Development*. 1995. V. 121. № 2. P. 273–285.
35. O'Carroll D., Erhardt S., Pagani M., Barton S.C., Surani M.A., Jenuwein T. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. № 13. P. 4330–4336.
36. Pasini D., Bracken A.P., Jensen M.R., Lazzerini Denchi E., Helin K. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 20. P. 4061–4071.
37. Ezhkova E., Lien W.H., Stokes N., Pasolli H.A., Silva J.M., Fuchs E. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 5. P. 485–498.
38. Shen X., Liu Y., Hsu Y.J., Fujiwara Y., Kim J., Mao X., Yuan G.C., Orkin S.H. // *Mol. Cell*. 2008. V. 32. № 4. P. 491–502.
39. Son J., Shen S.S., Margueron R., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 24. P. 2663–2677.
40. Ketel C.S., Andersen E.F., Vargas M.L., Suh J., Strome S., Simon J.A. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 16. P. 6857–6868.
41. Nekrasov M., Wild B., Muller J. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. № 4. P. 348–353.
42. Cao R., Zhang Y. // *Mol. Cell*. 2004. V. 15. № 1. P. 57–67.
43. Jiao L., Liu X. // *Science*. 2015. V. 350. № 6258. P. aac4383.
44. Nekrasov M., Klymenko T., Fraterman S., Papp B., Oktaba K., Kocher T., Cohen A., Stunnenberg H.G., Wilm M., Muller J. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 18. P. 4078–4088.
45. Sarma K., Margueron R., Ivanov A., Pirrotta V., Reinberg D. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 8. P. 2718–2731.
46. Herz H.M., Mohan M., Garrett A.S., Miller C., Casto D., Zhang Y., Seidel C., Haug J.S., Florens L., Washburn M.P., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 32. № 9. P. 1683–1693.
47. Francis N.J., Saurin A.J., Shao Z., Kingston R.E. // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. № 3. P. 545–556.
48. Saurin A.J., Shao Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Kingston R.E. // *Nature*. 2001. V. 412. № 6847. P. 655–660.
49. Shao Z., Raible F., Mollaaghababa R., Guyon J.R., Wu C.T., Bender W., Kingston R.E. // *Cell*. 1999. V. 98. № 1. P. 37–46.
50. Kang H., McElroy K.A., Jung Y.L., Alekseyenko A.A., Zee B.M., Park P.J., Kuroda M.I. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 11. P. 1136–1150.
51. Strubbe G., Popp C., Schmidt A., Pauli A., Ringrose L., Beisel C., Paro R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 14. P. 5572–5577.
52. Lo S.M., Ahuja N.K., Francis N.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 2. P. 515–525.
53. Lagarou A., Mohd-Sarip A., Moshkin Y.M., Chalkley G.E., Bezstarosti K., Demmers J.A., Verrijzer C.P. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 20. P. 2799–2810.
54. Hauri S., Comoglio F., Seimiya M., Gerstung M., Glatter T., Hansen K., Aebersold R., Paro R., Gstaiger M., Beisel C. // *Cell Rep.* 2016. V. 17. № 2. P. 583–595.
55. Levine S.S., Weiss A., Erdjument-Bromage H., Shao Z., Tempst P., Kingston R.E. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 17. P. 6070–6078.
56. Bejarano F., Gonzalez I., Vidal M., Busturia A. // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. № 10. P. 1118–1129.
57. Fereres S., Simon R., Mohd-Sarip A., Verrijzer C.P., Busturia A. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 11. P. e113255.
58. Francis N.J., Kingston R.E., Woodcock C.L. // *Science*. 2004. V. 306. № 5701. P. 1574–1577.
59. King I.F., Emmons R.B., Francis N.J., Wild B., Muller J., Kingston R.E., Wu C.T. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 15. P. 6578–6591.
60. King I.F., Francis N.J., Kingston R.E. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 22. P. 7919–7928.
61. Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y. // *Nature*. 2006. V. 439. № 7078. P. 811–816.
62. Fischle W., Wang Y., Jacobs S.A., Kim Y., Allis C.D., Khorasanizadeh S. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1870–1881.
63. Kaustov L., Ouyang H., Amaya M., Lemak A., Nady N., Duan S., Wasney G.A., Li Z., Vedadi M., Schapira M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 1. P. 521–529.
64. Min J., Zhang Y., Xu R.M. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1823–1828.
65. Gao Z., Zhang J., Bonasio R., Strino F., Sawai A., Parisi F., Kluger Y., Reinberg D. // *Mol. Cell*. 2012. V. 45. № 3. P. 344–356.
66. Kim C.A., Sawaya M.R., Cascio D., Kim W., Bowie J.U. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 30. P. 27769–27775.
67. Peterson A.J., Kyba M., Bornemann D., Morgan K., Brock H.W., Simon J. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 11. P. 6683–6692.
68. Wang L., Jahren N., Miller E.L., Ketel C.S., Mallin D.R., Simon J.A. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. № 11. P. 2584–2593.
69. Scheuermann J.C., de Ayala Alonso A.G., Oktaba K., Ly-Hartig N., McGinty R.K., Fraterman S., Wilm M., Muir T.W., Muller J. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 243–247.
70. Klymenko T., Papp B., Fischle W., Kocher T., Schelder M., Fritsch C., Wild B., Wilm M., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 9. P. 1110–1122.
71. Fritsch C., Brown J.L., Kassis J.A., Muller J. // *Development*. 1999. V. 126. № 17. P. 3905–3913.
72. Brown J.L., Fritsch C., Mueller J., Kassis J.A. // *Development*. 2003. V. 130. № 2. P. 285–294.
73. Kahn T.G., Stenberg P., Pirrotta V., Schwartz Y.B. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 7. P. e1004495.
74. Alfieri C., Gambetta M.C., Matos R., Glatt S., Sehr P., Fraterman S., Wilm M., Muller J., Muller C.W. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 21. P. 2367–2379.
75. Trojer P., Cao A.R., Gao Z., Li Y., Zhang J., Xu X., Li G., Losson R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., et al. // *Mol. Cell*. 2011. V. 42. № 4. P. 438–450.
76. Zhang J., Bonasio R., Strino F., Kluger Y., Holloway J.K., Modzelewski A.J., Cohen P.E., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 7. P. 749–766.

77. Bajusz I., Henry S., Sutus E., Kovacs G., Purity M.K. // *Genes* (Basel). 2019. V. 10. № 11. P. 1–33.
78. Zhan S., Wang T., Ge W., Li J. // *J. Cell. Mol. Med.* 2018. V. 22. № 4. P. 2046–2054.
79. Bracken A.P., Brien G.L., Verrijzer C.P. // *Genes Dev.* 2019. V. 33. № 15–16. P. 936–959.
80. Chalkley G.E., Moshkin Y.M., Langenberg K., Bezstarosti K., Blastyak A., Gyurkovics H., Demmers J.A., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 9. P. 2920–2929.
81. Mashtalir N., D'Avino A.R., Michel B.C., Luo J., Pan J., Otto J.E., Zullo H.J., McKenzie Z.M., Kubiak R.L., St Pierre R., et al. // *Cell.* 2018. V. 175. № 5. P. 1272–1288.
82. Mohrmann L., Langenberg K., Krijgsveld J., Kal A.J., Heck A.J., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 8. P. 3077–3088.
83. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., Kuzmina J.L., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 27. P. 11049–11054.
84. Mohan M., Herz H.M., Smith E.R., Zhang Y., Jackson J., Washburn M.P., Florens L., Eissenberg J.C., Shilatifard A. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 21. P. 4310–4318.
85. van Nuland R., Smits A.H., Pallaki P., Jansen P.W., Vermeulen M., Timmers H.T. // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. № 10. P. 2067–2077.
86. Shilatifard A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 65–95.
87. Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. № 12. P. 2361–2375.
88. Rickels R., Hu D., Collings C.K., Woodfin A.R., Piunti A., Mohan M., Herz H.M., Kvon E., Shilatifard A. // *Mol. Cell.* 2016. V. 63. № 2. P. 318–328.
89. Tie F., Banerjee R., Saiakhova A.R., Howard B., Monteith K.E., Scacheri P.C., Cosgrove M.S., Harte P.J. // *Development.* 2014. V. 141. № 5. P. 1129–1139.
90. Ardehali M.B., Mei A., Zobeck K.L., Caron M., Lis J.T., Kusch T. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 14. P. 2817–2828.
91. Hallson G., Hollebakk R.E., Li T., Syrzycka M., Kim I., Cotsworth S., Fitzpatrick K.A., Sinclair D.A., Honda B.M. // *Genetics.* 2012. V. 190. № 1. P. 91–100.
92. Herz H.M., Mohan M., Garruss A.S., Liang K., Takahashi Y.H., Mickey K., Voets O., Verrijzer C.P., Shilatifard A. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 23. P. 2604–2620.
93. Hu D., Gao X., Morgan M.A., Herz H.M., Smith E.R., Shilatifard A. // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. № 23. P. 4745–4754.
94. Agger K., Cloos P.A., Christensen J., Pasini D., Rose S., Rappsilber J., Issaeva I., Canaani E., Salcini A.E., Helin K. // *Nature.* 2007. V. 449. № 7163. P. 731–734.
95. De Santa F., Totaro M.G., Prosperini E., Notarbartolo S., Testa G., Natoli G. // *Cell.* 2007. V. 130. № 6. P. 1083–1094.
96. Hong S., Cho Y.W., Yu L.R., Yu H., Veenstra T.D., Ge K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 47. P. 18439–18444.
97. Lan F., Bayliss P.E., Rinn J.L., Whetstone J.R., Wang J.K., Chen S., Iwase S., Alpatov R., Issaeva I., Canaani E., et al. // *Nature.* 2007. V. 449. № 7163. P. 689–694.
98. Lee M.G., Villa R., Trojer P., Norman J., Yan K.P., Reinberg D., Di Croce L., Shiekhattar R. // *Science.* 2007. V. 318. № 5849. P. 447–450.
99. Smith E.R., Lee M.G., Winter B., Droz N.M., Eissenberg J.C., Shiekhattar R., Shilatifard A. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 3. P. 1041–1046.
100. Petruk S., Sedkov Y., Smith S., Tillib S., Kraevski V., Nakamura T., Canaani E., Croce C.M., Mazo A. // *Science.* 2001. V. 294. № 5545. P. 1331–1334.
101. Tie F., Banerjee R., Stratton C.A., Prasad-Sinha J., Stepanik V., Zlobin A., Diaz M.O., Scacheri P.C., Harte P.J. // *Development.* 2009. V. 136. № 18. P. 3131–3141.
102. Jin Q., Yu L.R., Wang L., Zhang Z., Kasper L.H., Lee J.E., Wang C., Brindle P.K., Dent S.Y., Ge K. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 2. P. 249–262.
103. Barnes C.E., English D.M., Cowley S.M. // *Essays Biochem.* 2019. V. 63. № 1. P. 97–107.
104. An S., Yeo K.J., Jeon Y.H., Song J.J. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 10. P. 8369–8374.
105. Tanaka Y., Katagiri Z., Kawahashi K., Kioussis D., Kitajima S. // *Gene.* 2007. V. 397. № 1–2. P. 161–168.
106. Yuan W., Xu M., Huang C., Liu N., Chen S., Zhu B. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 10. P. 7983–7989.
107. Dorighi K.M., Tamkun J.W. // *Development.* 2013. V. 140. № 20. P. 4182–4192.
108. Daubresse G., Deuring R., Moore L., Papoulas O., Zakrajsek I., Waldrip W.R., Scott M.P., Kennison J.A., Tamkun J.W. // *Development.* 1999. V. 126. № 6. P. 1175–1187.
109. Hallson G., Syrzycka M., Beck S.A., Kennison J.A., Dorsett D., Page S.L., Hunter S.M., Keall R., Warren W.D., Brock H.W., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 34. P. 12405–12410.
110. Dorsett D. // *Trends Genet.* 2019. V. 35. № 7. P. 542–551.
111. Putlyaev E.V., Ibragimov A.N., Lebedeva L.A., Georgiev P.G., Shidlovskii Y.V. // *Biochemistry (Moscow).* 2018. V. 83. № 4. P. 423–436.
112. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenomes.* 2018. V. 2. № 1. P. 1–24.
113. Kassis J.A., Brown J.L. // *Adv. Genet.* 2013. V. 81. P. 83–118.
114. McElroy K.A., Kang H., Kuroda M.I. // *Open Biol.* 2014. V. 4. P. 140006.
115. Steffen P.A., Ringrose L. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2014. V. 15. № 5. P. 340–356.
116. Muller J., Bienz M. // *EMBO J.* 1991. V. 10. № 11. P. 3147–3155.
117. Erceg J., Pakozdi T., Marco-Ferreres R., Ghavi-Helm Y., Girardot C., Bracken A.P., Furlong E.E. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 6. P. 590–602.
118. Erokhin M., Elizar'ev P., Parshikov A., Schedl P., Georgiev P., Chetverina D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
119. Langlais K.K., Brown J.L., Kassis J.A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e48765.
120. Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., Chetverina D.A., Georgiev P.G., Erokhin M.M. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 2. P. 79–86.
121. Arora M., Packard C.Z., Banerjee T., Parvin J.D. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 5. P. 2136–2144.
122. Chan H.L., Beckedorff F., Zhang Y., Garcia-Huidobro J., Jiang H., Colaprico A., Bilbao D., Figueroa M.E., LaCava J., Shiekhattar R., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 3377.
123. Frangini A., Sjöberg M., Roman-Trufero M., Dharmalingam G., Haberer V., Bartke T., Lenhard B., Malumbres M., Vidal M., Dillon N. // *Mol. Cell.* 2013. V. 51. № 5. P. 647–661.
124. Schaaf C.A., Misulovin Z., Gause M., Koenig A., Gohara D.W., Watson A., Dorsett D. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 6. P. e1003560.
125. Brown J.L., Sun M.A., Kassis J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 8. P. E1839–E1848.
126. Dejardin J., Cavalli G. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 4. P. 857–868.
127. DeVido S.K., Kwon D., Brown J.L., Kassis J.A. // *Development.* 2008. V. 135. № 4. P. 669–676.
128. Fujioka M., Yusibova G.L., Zhou J., Jaynes J.B. // *Development.* 2008. V. 135. № 24. P. 4131–4139.
129. Bodor C., Grossmann V., Popov N., Okosun J., O'Riain C., Tan K., Marzec J., Araf S., Wang J., Lee A.M., et al. // *Blood.*

2013. V. 122. № 18. P. 3165–3168.
130. Kwong C., Adryan B., Bell I., Meadows L., Russell S., Manak J.R., White R. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 9. P. e1000178.
131. Bachmann I.M., Halvorsen O.J., Collett K., Stefansson I.M., Straume O., Haukaas S.A., Salvesen H.B., Otte A.P., Akslen L.A. // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 24. № 2. P. 268–273.
132. Schuettengruber B., Ganapathi M., Leblanc B., Portoso M., Jaschek R., Tolhuis B., van Lohuizen M., Tanay A., Cavalli G. // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. № 1. P. e13.
133. Wang L., Brown J.L., Cao R., Zhang Y., Kassis J.A., Jones R.S. // *Mol. Cell.* 2004. V. 14. № 5. P. 637–646.
134. Mohd-Sarip A., Venturini F., Chalkley G.E., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 21. P. 7473–7483.
135. Ray P., De S., Mitra A., Bezstarosti K., Demmers J.A., Pfeifer K., Kassis J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831.
136. Blastyak A., Mishra R.K., Karch F., Gyurkovics H. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 4. P. 1434–1444.
137. Dejardin J., Rappailles A., Cuvier O., Grimaud C., Decoville M., Locker D., Cavalli G. // *Nature.* 2005. V. 434. № 7032. P. 533–538.
138. Mahmoudi T., Zuijderduijn L.M., Mohd-Sarip A., Verrijzer C.P. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. № 14. P. 4147–4156.
139. Tuckfield A., Clouston D.R., Wilanowski T.M., Zhao L.L., Cunningham J.M., Jane S.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 6. P. 1936–1946.
140. Shokri L., Inukai S., Hafner A., Weinand K., Hens K., Vedenko A., Gisselbrecht S.S., Dainese R., Bischof J., Furger E., et al. // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 3. P. 955–970.
141. Frey F., Sheahan T., Finkl K., Stoehr G., Mann M., Benda C., Muller J. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 9. P. 1116–1127.
142. Grimm C., Matos R., Ly-Hartig N., Steuerwald U., Lindner D., Rybin V., Muller J., Muller C.W. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 13. P. 1965–1977.
143. Kal A.J., Mahmoudi T., Zak N.B., Verrijzer C.P. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 9. P. 1058–1071.
144. Nakayama T., Shimojima T., Hirose S. // *Development.* 2012. V. 139. № 24. P. 4582–4590.
145. Arnold P., Scholer A., Pachkov M., Balwierz P.J., Jorgensen H., Stadler M.B., van Nimwegen E., Schubeler D. // *Genome Res.* 2013. V. 23. № 1. P. 60–73.
146. Cameron S.R., Nandi S., Kahn T.G., Barrasa J.I., Stenberg P., Schwartz Y.B. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 37. P. 14342–14358.
147. Corley M., Kroll K.L. // *Cell Tissue Res.* 2015. V. 359. № 1. P. 65–85.
148. Dietrich N., Lerdrup M., Landt E., Agrawal-Singh S., Bak M., Tommerup N., Rappsilber J., Sodersten E., Hansen K. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 3. P. e1002494.
149. Woo C.J., Kharchenko P.V., Daheron L., Park P.J., Kingston R.E. // *Cell.* 2010. V. 140. № 1. P. 99–110.
150. Jermann P., Hoerner L., Burger L., Schubeler D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 33. P. 3415–3421.
151. Lynch M.D., Smith A.J., De Gobbi M., Flenley M., Hughes J.R., Vernimmen D., Ayyub H., Sharpe J.A., Sloane-Stanley J.A., Sutherland L., et al. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 2. P. 317–329.
152. Mendenhall E.M., Koche R.P., Truong T., Zhou V.W., Issac B., Chi A.S., Ku M., Bernstein B.E. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 12. P. e1001244.
153. Kahn T.G., Dorafshan E., Schultheis D., Zare A., Stenberg P., Reim I., Pirrotta V., Schwartz Y.B. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 21. P. 10132–10149.
154. Tavares L., Dimitrova E., Oxley D., Webster J., Poot R., Demmers J., Bezstarosti K., Taylor S., Ura H., Koide H., et al. // *Cell.* 2012. V. 148. № 4. P. 664–678.
155. Illingworth R.S., Moffat M., Mann A.R., Read D., Hunter C.J., Pradeepa M.M., Adams I.R., Bickmore W.A. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 18. P. 1897–1902.
156. Pengelly A.R., Kalb R., Finkl K., Muller J. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 14. P. 1487–1492.
157. Blackledge N.P., Fursova N.A., Kelley J.R., Huseyin M.K., Feldmann A., Klose R.J. // *Mol. Cell.* 2020. V. 77. № 4. P. 857–874 e859.
158. Tamburri S., Lavarone E., Fernandez-Perez D., Conway E., Zanolli M., Manganaro D., Pasini D. // *Mol. Cell.* 2020. V. 77. № 4. P. 840–856.
159. Silva J., Mak W., Zvetkova I., Appanah R., Nesterova T.B., Webster Z., Peters A.H., Jenuwein T., Otte A.P., Brockdorff N. // *Dev. Cell.* 2003. V. 4. № 4. P. 481–495.
160. Mager J., Montgomery N.D., de Villena F.P., Magnuson T. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 4. P. 502–507.
161. Rinn J.L., Chang H.Y. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 145–166.
162. Hendrickson D.G., Kelley D.R., Tenen D., Bernstein B., Rinn J.L. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. P. 28.
163. Davidovich C., Zheng L., Goodrich K.J., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 11. P. 1250–1257.
164. Wang X., Goodrich K.J., Gooding A.R., Naeem H., Archer S., Paucek R.D., Youmans D.T., Cech T.R., Davidovich C. // *Mol. Cell.* 2017. V. 65. № 6. P. 1056–1067.
165. Almeida M., Pintacuda G., Masui O., Koseki Y., Gdula M., Cerase A., Brown D., Mould A., Innocent C., Nakayama M., et al. // *Science.* 2017. V. 356. № 6342. P. 1081–1084.
166. Cognigni D., Sunwoo H., Kriz A.J., Wang C.Y., Lee J.T. // *Mol. Cell.* 2019. V. 74. № 1. P. 101–117.
167. Pintacuda G., Wei G., Roustan C., Kirmizitas B.A., Solcan N., Cerase A., Castello A., Mohammed S., Moindrot B., Nesterova T.B., et al. // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. № 5. P. 955–969.
168. Paziewska A., Wyrwicz L.S., Bujnicki J.M., Bomsztyk K., Ostrowski J. // *FEBS Lett.* 2004. V. 577. № 1–2. P. 134–140.
169. Almeida M., Bowness J.S., Brockdorff N. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2020. V. 61. P. 53–61.
170. Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.
171. Chang Y.L., Peng Y.H., Pan I.C., Sun D.S., King B., Huang D.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 17. P. 9730–9735.
172. Tie F., Prasad-Sinha J., Birve A., Rasmuson-Lestander A., Harte P.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 9. P. 3352–3362.
173. van der Vlag J., Otte A.P. // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. № 4. P. 474–478.
174. Schmitges F.W., Prusty A.B., Faty M., Stutzer A., Lingaraju G.M., Aiwazian J., Sack R., Hess D., Li L., Zhou S., et al. // *Mol. Cell.* 2011. V. 42. № 3. P. 330–341.
175. Bonev B., Cavalli G. // *Nat. Rev. Genet.* 2016. V. 17. № 11. P. 661–678.
176. Cheutin T., Cavalli G. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2019. V. 54. № 5. P. 399–417.
177. Razin S.V., Ulianov S.V. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2017. V. 22. P. 18.
178. Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 4. P. eaaw1668.
179. Kassis J.A. // *Genetics.* 1994. V. 136. № 3. P. 1025–1038.
180. Kassis J.A. // *Adv. Genet.* 2002. V. 46. P. 421–438.
181. Mallin D.R., Myung J.S., Patton J.S., Geyer P.K. // *Genetics.* 1998. V. 148. № 1. P. 331–339.
182. Sigrist C.J., Pirrotta V. // *Genetics.* 1997. V. 147. № 1. P. 209–221.
183. Ogiyama Y., Schuettengruber B., Papadopoulos G.L., Chang

- J.M., Cavalli G. // *Mol. Cell.* 2018. V. 71. № 1. P. 73–88.
184. Chetverina D., Aoki T., Erokhin M., Georgiev P., Schedl P. // *Bioessays.* 2014. V. 36. № 2. P. 163–172.
185. Mittal P., Roberts C.W.M. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020. V. 17. № 4. P. 435–448.
186. Fagan R.J., Dingwall A.K. // *Cancer Lett.* 2019. V. 458. P. 56–65.
187. Zhao Z., Shilatifard A. // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 245.
188. Jangal M., Lebeau B., Witcher M. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2019. V. 23. № 7. P. 565–578.
189. Hoy S.M. // *Drugs.* 2020. V. 80. № 5. P. 513–521.
190. Italiano A. // *J. Hematol. Oncol.* 2020. V. 13. № 1. P. 33.
191. Rothbart S.B., Baylin S.B. // *Cell.* 2020. V. 181. № 2. P. 211.
192. Kim K.H., Roberts C.W. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 2. P. 128–134.
193. Lue J.K., Amengual J.E. // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2018. V. 13. № 5. P. 369–382.
194. Yamagishi M., Uchimar K. // *Curr. Opin. Oncol.* 2017. V. 29. № 5. P. 375–381.
195. Bracken A.P., Pasini D., Capra M., Prosperini E., Colli E., Helin K. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 20. P. 5323–5335.
196. Iliopoulos D., Lindahl-Allen M., Polytarchou C., Hirsch H.A., Tsiichlis P.N., Struhl K. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 5. P. 761–772.
197. Azizmohammadi S., Azizmohammadi S., Safari A., Kaghazian M., Sadrkhanlo M., Behnod V., Seifoleslami M. // *Oncol. Res.* 2017. V. 25. № 4. P. 495–501.
198. Borbone E., Troncone G., Ferraro A., Jasencakova Z., Stojic L., Esposito F., Hornig N., Fusco A., Orlando V. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. V. 96. № 4. P. 1029–1038.
199. Cao W., Ribeiro Rde O., Liu D., Saintigny P., Xia R., Xue Y., Lin R., Mao L., Ren H. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. e52984.
200. Ciarapica R., Russo G., Verginelli F., Raimondi L., Donfrancesco A., Rota R., Giordano A. // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 1. P. 172–175.
201. Collett K., Eide G.E., Arnes J., Stefansson I.M., Eide J., Braaten A., Aas T., Otte A.P., Akslen L.A. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. № 4. P. 1168–1174.
202. Crea F., Hurt E.M., Mathews L.A., Cabarcas S.M., Sun L., Marquez V.E., Danesi R., Farrar W.L. // *Mol. Cancer.* 2011. V. 10. P. 40.
203. Gonzalez M.E., Moore H.M., Li X., Toy K.A., Huang W., Sabel M.S., Kidwell K.M., Kleer C.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 8. P. 3098–3103.
204. He L.J., Cai M.Y., Xu G.L., Li J.J., Weng Z.J., Xu D.Z., Luo G.Y., Zhu S.L., Xie D. // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2012. V. 13. № 7. P. 3173–3178.
205. Jia N., Li Q., Tao X., Wang J., Hua K., Feng W. // *Oncol. Lett.* 2014. V. 8. № 5. P. 2049–2054.
206. Kienle D., Katzenberger T., Ott G., Saupe D., Benner A., Kohlhammer H., Barth T.F., Holler S., Kalla J., Rosenwald A., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2007. V. 25. № 19. P. 2770–2777.
207. Kikuchi J., Kinoshita I., Shimizu Y., Kikuchi E., Konishi J., Oizumi S., Kaga K., Matsuno Y., Nishimura M., Dosaka-Akita H. // *Cancer.* 2010. V. 116. № 12. P. 3015–3024.
208. Kleer C.G., Cao Q., Varambally S., Shen R., Ota I., Tomlins S.A., Ghosh D., Sewalt R.G., Otte A.P., Hayes D.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 20. P. 11606–11611.
209. Lee S.R., Roh Y.G., Kim S.K., Lee J.S., Seol S.Y., Lee H.H., Kim W.T., Kim W.J., Heo J., Cha H.J., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 23. P. 5391–5403.
210. Lei Q., Shen F., Wu J., Zhang W., Wang J., Zhang L. // *Oncol. Rep.* 2014. V. 32. № 1. P. 261–269.
211. Li H., Cai Q., Godwin A.K., Zhang R. // *Mol. Cancer Res.* 2010. V. 8. № 12. P. 1610–1618.
212. Li H., Cai Q., Wu H., Vathipadiakal V., Dobbin Z.C., Li T., Hua X., Landen C.N., Birrer M.J., Sanchez-Beato M., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2012. V. 10. № 11. P. 1462–1472.
213. Lin Y.L., Zou Z.K., Su H.Y., Huang Y.Q. // *Zhongguo. Shi. Yan. Xue. Ye. Xue. Za. Zhi.* 2019. V. 27. № 3. P. 820–826.
214. Liu H., Li W., Yu X., Gao F., Duan Z., Ma X., Tan S., Yuan Y., Liu L., Wang J., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 35. P. 56338–56354.
215. Liu Y.L., Gao X., Jiang Y., Zhang G., Sun Z.C., Cui B.B., Yang Y.M. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015. V. 141. № 4. P. 661–669.
216. Lu C., Han H.D., Mangala L.S., Ali-Fehmi R., Newton C.S., Ozbun L., Armaiz-Pena G.N., Hu W., Stone R.L., Munkarah A., et al. // *Cancer Cell.* 2010. V. 18. № 2. P. 185–197.
217. Martin-Perez D., Sanchez E., Maestre L., Suela J., Vargiu P., Di Lisio L., Martinez N., Alves J., Piris M.A., Sanchez-Beato M. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 177. № 2. P. 930–942.
218. Masudo K., Suganuma N., Nakayama H., Oshima T., Rino Y., Iwasaki H., Matsuzo K., Sugino K., Ito K., Kondo T., et al. // *In Vivo.* 2018. V. 32. № 1. P. 25–31.
219. Nakagawa S., Okabe H., Sakamoto Y., Hayashi H., Hashimoto D., Yokoyama N., Sakamoto K., Kuroki H., Mima K., Nitta H., et al. // *Ann. Surg. Oncol.* 2013. V. 20 Suppl 3. P. S667–675.
220. Ohuchi M., Sakamoto Y., Tokunaga R., Kiyozumi Y., Nakamura K., Izumi D., Kosumi K., Harada K., Kurashige J., Iwatsuki M., et al. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 4. P. 5275–5281.
221. Okosun J., Bodor C., Wang J., Araf S., Yang C.Y., Pan C., Boller S., Cittaro D., Bozek M., Iqbal S., et al. // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 2. P. 176–181.
222. Pan Y.M., Wang C.G., Zhu M., Xing R., Cui J.T., Li W.M., Yu D.D., Wang S.B., Zhu W., Ye Y.J., et al. // *Mol. Cancer.* 2016. V. 15. № 1. P. 79.
223. Pawlyn C., Bright M.D., Buros A.F., Stein C.K., Walters Z., Aronson L.I., Mirabella F., Jones J.R., Kaiser M.F., Walker B.A., et al. // *Blood Cancer J.* 2017. V. 7. № 3. P. e549.
224. Pietersen A.M., Horlings H.M., Hauptmann M., Langerod A., Ajouaou A., Cornelissen-Steijger P., Wessels L.F., Jonkers J., van de Vijver M.J., van Lohuizen M. // *Breast Cancer Res.* 2008. V. 10. № 6. P. R109.
225. Puppe J., Drost R., Liu X., Joesse S.A., Evers B., Cornelissen-Steijger P., Nederlof P., Yu Q., Jonkers J., van Lohuizen M., et al. // *Breast Cancer Res.* 2009. V. 11. № 4. P. R63.
226. Saramaki O.R., Tammela T.L., Martikainen P.M., Vessella R.L., Visakorpi T. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2006. V. 45. № 7. P. 639–645.
227. Sudo T., Utsunomiya T., Mimori K., Nagahara H., Ogawa K., Inoue H., Wakiyama S., Fujita H., Shirouzu K., Mori M. // *Br. J. Cancer.* 2005. V. 92. № 9. P. 1754–1758.
228. Takawa M., Masuda K., Kunizaki M., Daigo Y., Takagi K., Iwai Y., Cho H.S., Toyokawa G., Yamane Y., Maejima K., et al. // *Cancer Sci.* 2011. V. 102. № 7. P. 1298–1305.
229. Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M., Barrette T.R., Kumar-Sinha C., Sanda M.G., Ghosh D., Pienta K.J., Sewalt R.G., Otte A.P., et al. // *Nature.* 2002. V. 419. № 6907. P. 624–629.
230. Wagener N., Macher-Goeppinger S., Pritsch M., Husing J., Hoppe-Seyler K., Schirmacher P., Pfitzenmaier J., Haferkamp A., Hoppe-Seyler F., Hohenfellner M. // *BMC Cancer.* 2010. V. 10. P. 524.
231. Wang C.G., Ye Y.J., Yuan J., Liu F.F., Zhang H., Wang S. // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. № 19. P. 2421–2427.
232. Wilson B.G., Wang X., Shen X., McKenna E.S., Lemieux M.E., Cho Y.J., Koellhoffer E.C., Pomeroy S.L., Orkin S.H.,

- Roberts C.W. // *Cancer Cell*. 2010. V. 18. № 4. P. 316–328.
233. Xia R., Jin F.Y., Lu K., Wan L., Xie M., Xu T.P., De W., Wang Z.X. // *Tumour Biol*. 2015. V. 36. № 7. P. 5341–5351.
234. Yan J., Ng S.B., Tay J.L., Lin B., Koh T.L., Tan J., Selvarajan V., Liu S.C., Bi C., Wang S., et al. // *Blood*. 2013. V. 121. № 22. P. 4512–4520.
235. Yu H., Simons D.L., Segall I., Carcamo-Cavazos V., Schwartz E.J., Yan N., Zuckerman N.S., Dirbas F.M., Johnson D.L., Holmes S.P., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. P. e51239.
236. Zhang M.J., Chen D.S., Li H., Liu W.W., Han G.Y., Han Y.F. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2019. V. 12. № 6. P. 2184–2194.
237. Abudurexiti M., Xie H., Jia Z., Zhu Y., Shi G., Zhang H., Dai B., Wan F., Shen Y., et al. // *Front. Oncol*. 2019. V. 9. P. 856.
238. Liu C., Shi X., Wang L., Wu Y., Jin F., Bai C., Song Y. // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. № 6. P. 6073–6082.
239. Bodor C., O’Riain C., Wrench D., Matthews J., Iyengar S., Tayyib H., Calaminici M., Clear A., Iqbal S., Quentmeier H., et al. // *Leukemia*. 2011. V. 25. № 4. P. 726–729.
240. Lohr J.G., Stojanov P., Lawrence M.S., Auclair D., Chapuy B., Sougnez C., Cruz-Gordillo P., Knoechel B., Asmann Y.W., Slager S.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 10. P. 3879–3884.
241. Majer C.R., Jin L., Scott M.P., Knutson S.K., Kuntz K.W., Keilhack H., Smith J.J., Moyer M.P., Richon V.M., Copeland R.A., et al. // *FEBS Lett*. 2012. V. 586. № 19. P. 3448–3451.
242. Morin R.D., Johnson N.A., Severson T.M., Mungall A.J., An J., Goya R., Paul J.E., Boyle M., Woolcock B.W., Kuchenbauer F., et al. // *Nat. Genet*. 2010. V. 42. № 2. P. 181–185.
243. Morin R.D., Mendez-Lago M., Mungall A.J., Goya R., Mungall K.L., Corbett R.D., Johnson N.A., Severson T.M., Chiu R., Field M., et al. // *Nature*. 2011. V. 476. № 7360. P. 298–303.
244. Reddy A., Zhang J., Davis N.S., Moffitt A.B., Love C.L., Waldrop A., Leppa S., Pasanen A., Meriranta L., Karjalainen-Lindsberg M.L., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 2. P. 481–494.
245. Ryan R.J., Nitta M., Borger D., Zukerberg L.R., Ferry J.A., Harris N.L., Iafrate A.J., Bernstein B.E., Sohani A.R., Le L.P. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. P. e28585.
246. McCabe M.T., Graves A.P., Ganji G., Diaz E., Halsey W.S., Jiang Y., Smitheman K.N., Ott H.M., Pappalardi M.B., Allen K.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 8. P. 2989–2994.
247. Ott H.M., Graves A.P., Pappalardi M.B., Huddleston M., Halsey W.S., Hughes A.M., Groy A., Dul E., Jiang Y., Bai Y., et al. // *Mol. Cancer Ther*. 2014. V. 13. № 12. P. 3062–3073.
248. Sneeringer C.J., Scott M.P., Kuntz K.W., Knutson S.K., Pollock R.M., Richon V.M., Copeland R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 49. P. 20980–20985.
249. Yap D.B., Chu J., Berg T., Schapira M., Cheng S.W., Moradian A., Morin R.D., Mungall A.J., Meissner B., Boyle M., et al. // *Blood*. 2011. V. 117. № 8. P. 2451–2459.
250. Calebiro D., Grassi E.S., Eszlinger M., Ronchi C.L., Godbole A., Bathon K., Guizzardi F., de Filippis T., Krohn K., Jaeschke H., et al. // *J. Clin. Invest*. 2016. V. 126. № 9. P. 3383–3388.
251. Bejar R., Stevenson K., Abdel-Wahab O., Galili N., Nilsson B., Garcia-Manero G., Kantarjian H., Raza A., Levine R.L., Neuberg D., et al. // *N. Engl. J. Med*. 2011. V. 364. № 26. P. 2496–2506.
252. De Raedt T., Beert E., Pasmant E., Luscan A., Brems H., Ortonne N., Helin K., Hornick J.L., Mautner V., Kehrer-Sawatzki H., et al. // *Nature*. 2014. V. 514. № 7521. P. 247–251.
253. Ernst T., Chase A.J., Score J., Hidalgo-Curtis C.E., Bryant C., Jones A.V., Waghorn K., Zoi K., Ross F.M., Reiter A., et al. // *Nat. Genet*. 2010. V. 42. № 8. P. 722–726.
254. Guglielmelli P., Biamonte F., Score J., Hidalgo-Curtis C., Cervantes F., Maffioli M., Fanelli T., Ernst T., Winkelmann N., Jones A.V., et al. // *Blood*. 2011. V. 118. № 19. P. 5227–5234.
255. Khan S.N., Jankowska A.M., Mahfouz R., Dunbar A.J., Sugimoto Y., Hosono N., Hu Z., Cheriya V., Vatolin S., Przychodzen B., et al. // *Leukemia*. 2013. V. 27. № 6. P. 1301–1309.
256. Koontz J.I., Soreng A.L., Nucci M., Kuo F.C., Pauwels P., van Den Berghe H., Dal Cin P., Fletcher J.A., Sklar J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 11. P. 6348–6353.
257. Lee W., Teckie S., Wiesner T., Ran L., Prieto Granada C.N., Lin M., Zhu S., Cao Z., Liang Y., Sboner A., et al. // *Nat. Genet*. 2014. V. 46. № 11. P. 1227–1232.
258. Li H., Ma X., Wang J., Koontz J., Nucci M., Sklar J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 50. P. 20001–20006.
259. Ma X., Wang J., Wang J., Ma C.X., Gao X., Patriub V., Sklar J.L. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 3. P. 4062–4078.
260. Makise N., Sekimizu M., Kobayashi E., Yoshida H., Fukayama M., Kato T., Kawai A., Ichikawa H., Yoshida A. // *Virchows Arch*. 2019. V. 475. № 4. P. 527–531.
261. Nikoloski G., Langemeijer S.M., Kuiper R.P., Knops R., Massop M., Tonnissen E.R., van der Heijden A., Scheele T.N., Vandenberghe P., de Witte T., et al. // *Nat. Genet*. 2010. V. 42. № 8. P. 665–667.
262. Ntziachristos P., Tsirigos A., van Vlierberghe P., Nedjic J., Trimarchi T., Flaherty M.S., Ferres-Marco D., da Ros V., Tang Z., Siegle J., et al. // *Nat. Med*. 2012. V. 18. № 2. P. 298–301.
263. Puda A., Milosevic J.D., Berg T., Klampfl T., Harutyunyan A.S., Gisslinger B., Rumi E., Pietra D., Malcovati L., Elena C., et al. // *Am. J. Hematol*. 2012. V. 87. № 3. P. 245–250.
264. Score J., Hidalgo-Curtis C., Jones A.V., Winkelmann N., Skinner A., Ward D., Zoi K., Ernst T., Stegelmann F., Dohner K., et al. // *Blood*. 2012. V. 119. № 5. P. 1208–1213.
265. Ueda T., Sanada M., Matsui H., Yamasaki N., Honda Z.I., Shih L.Y., Mori H., Inaba T., Ogawa S., Honda H. // *Leukemia*. 2012. V. 26. № 12. P. 2557–2560.
266. Zhang J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G., Heatley S.L., Payne-Turner D., Easton J., Chen X., Wang J., Rusch M., et al. // *Nature*. 2012. V. 481. № 7380. P. 157–163.
267. Zhang M., Wang Y., Jones S., Sausen M., McMahon K., Sharma R., Wang Q., Belzberg A.J., Chaichana K., Gallia G.L., et al. // *Nat. Genet*. 2014. V. 46. № 11. P. 1170–1172.
268. Zhang Q., Han Q., Zi J., Ma J., Song H., Tian Y., McGrath M., Song C., Ge Z. // *Genes Dis*. 2019. V. 6. № 3. P. 276–281.
269. Bender S., Tang Y., Lindroth A.M., Hovestadt V., Jones D.T., Kool M., Zapatka M., Northcott P.A., Sturm D., Wang W., et al. // *Cancer Cell*. 2013. V. 24. № 5. P. 660–672.
270. Chan K.M., Fang D., Gan H., Hashizume R., Yu C., Schroeder M., Gupta N., Mueller S., James C.D., Jenkins R., et al. // *Genes Dev*. 2013. V. 27. № 9. P. 985–990.
271. Justin N., Zhang Y., Tarricone C., Martin S.R., Chen S., Underwood E., De Marco V., Haire L.F., Walker P.A., Reinberg D., et al. // *Nat. Commun*. 2016. V. 7. P. 11316.
272. Lewis P.W., Muller M.M., Koletsky M.S., Cordero F., Lin S., Banaszynski L.A., Garcia B.A., Muir T.W., Becher O.J., Allis C.D. // *Science*. 2013. V. 340. № 6134. P. 857–861.
273. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.Y., Jones D.T., Pfaff E., Jacob K., Sturm D., Fontebasso A.M., Quang D.A., Tonjes M., et al. // *Nature*. 2012. V. 482. № 7384. P. 226–231.
274. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A., Jones D.T., Konermann C., Pfaff E., Tonjes M., Sill M., Bender S., et al. // *Cancer Cell*. 2012. V. 22. № 4. P. 425–437.
275. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A., Lu C., Paugh B.S., Becksfort J., Qu C., Ding L., Huether R., Parker M., et al. // *Nat. Genet*. 2012. V. 44. № 3. P. 251–253.
276. Boileau M., Shirinian M., Gayden T., Harutyunyan A.S.,

- Chen C.C.L., Mikael L.G., Duncan H.M., Neumann A.L., Arreba-Tutusaus P., De Jay N., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2891.
277. Lee C.H., Yu J.R., Granat J., Saldana-Meyer R., Andrade J., LeRoy G., Jin Y., Lund P., Stafford J.M., Garcia B.A., et al. // *Genes Dev.* 2019. V. 33. № 19–20. P. 1428–1440.
278. Hubner J.M., Muller T., Papageorgiou D.N., Mauermann M., Krijgsveld J., Russell R.B., Ellison D.W., Pfister S.M., Pajtler K.W., Kool M. // *Neuro Oncol.* 2019. V. 21. № 7. P. 878–889.
279. Jain S.U., Do T.J., Lund P.J., Rashoff A.Q., Diehl K.L., Cieslik M., Bajic A., Juretic N., Deshmukh S., Venneti S., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2146.
280. Piunti A., Smith E.R., Morgan M.A.J., Ugarenko M., Khaltyn N., Helmin K.A., Ryan C.A., Murray D.C., Rickels R.A., Yilmaz B.D., et al. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 7. P. eaax2887.
281. Ragazzini R., Perez-Palacios R., Baymaz I.H., Diop S., Ancelin K., Zielinski D., Michaud A., Givélet M., Borsos M., Aflaki S., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3858.
282. Beguelin W., Popovic R., Teater M., Jiang Y., Bunting K.L., Rosen M., Shen H., Yang S.N., Wang L., Ezponda T., et al. // *Cancer Cell.* 2013. V. 23. № 5. P. 677–692.
283. Chang C.J., Yang J.Y., Xia W., Chen C.T., Xie X., Chao C.H., Woodward W.A., Hsu J.M., Hortobagyi G.N., Hung M.C. // *Cancer Cell.* 2011. V. 19. № 1. P. 86–100.
284. Herrera-Merchan A., Arranz L., Ligos J.M., de Molina A., Dominguez O., Gonzalez S. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 623.
285. Min J., Zaslavsky A., Fedele G., McLaughlin S.K., Reczek E.E., De Raedt T., Guney I., Strohlic D.E., Macconail L.E., Beroukhim R., et al. // *Nat. Med.* 2010. V. 16. № 3. P. 286–294.
286. Berg T., Thoene S., Yap D., Wee T., Schoeler N., Rosten P., Lim E., Bilenky M., Mungall A.J., Oellerich T., et al. // *Blood.* 2014. V. 123. № 25. P. 3914–3924.
287. Abdel-Wahab O., Dey A. // *Leukemia.* 2013. V. 27. № 1. P. 10–15.
288. Danis E., Yamauchi T., Echanique K., Zhang X., Haladyna J.N., Riedel S.S., Zhu N., Xie H., Orkin S.H., Armstrong S.A., et al. // *Cell Rep.* 2016. V. 14. № 8. P. 1953–1965.
289. Booth C.A.G., Barkas N., Neo W.H., Boukarabila H., Soilleux E.J., Giotopoulos G., Farnoud N., Giustacchini A., Ashley N., Carrelha J., et al. // *Cancer Cell.* 2018. V. 33. № 2. P. 274–291.
290. Wang C., Oshima M., Sato D., Matsui H., Kubota S., Aoyama K., Nakajima-Takagi Y., Koide S., Matsubayashi J., Mochizuki-Kashio M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2018. V. 128. № 9. P. 3872–3886.
291. Broux M., Prieto C., Demeyer S., Vanden Bempt M., Alberti-Servera L., Lodewijckx I., Vandepoel R., Mentens N., Gielen O., Jacobs K., et al. // *Blood.* 2019. V. 134. № 16. P. 1323–1336.
292. Sashida G., Harada H., Matsui H., Oshima M., Yui M., Harada Y., Tanaka S., Mochizuki-Kashio M., Wang C., Saraya A., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4177.
293. Maertens O., Cichowski K. // *Adv. Biol. Regul.* 2014. V. 55. P. 1–14.
294. Abdel-Wahab O., Adli M., LaFave L.M., Gao J., Hricik T., Shih A.H., Pandey S., Patel J.P., Chung Y.R., Koche R., et al. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 2. P. 180–193.
295. Lane A.A., Chapuy B., Lin C.Y., Tivey T., Li H., Townsend E.C., van Bodegom D., Day T.A., Wu S.C., Liu H., et al. // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 6. P. 618–623.
296. Simon C., Chagraoui J., Kros J., Gendron P., Wilhelm B., Lemieux S., Boucher G., Chagnon P., Drouin S., Lambert R., et al. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 7. P. 651–656.
297. Souroullas G.P., Jeck W.R., Parker J.S., Simon J.M., Liu J.Y., Paulk J., Xiong J., Clark K.S., Fedoriw Y., Qi J., et al. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 6. P. 632–640.
298. Tan J., Yang X., Zhuang L., Jiang X., Chen W., Lee P.L., Karuturi R.K., Tan P.B., Liu E.T., Yu Q. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. № 9. P. 1050–1063.
299. Miranda T.B., Cortez C.C., Yoo C.B., Liang G., Abe M., Kelly T.K., Marquez V.E., Jones P.A. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 6. P. 1579–1588.
300. Knutson S.K., Wigle T.J., Warholc N.M., Sneeringer C.J., Allain C.J., Klaus C.R., Sacks J.D., Raimondi A., Majer C.R., Song J., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2012. V. 8. № 11. P. 890–896.
301. McCabe M.T., Ott H.M., Ganji G., Korenchuk S., Thompson C., Van Aller G.S., Liu Y., Graves A.P., Della Pietra A., 3rd, Diaz E., et al. // *Nature.* 2012. V. 492. № 7427. P. 108–112.
302. Qi W., Chan H., Teng L., Li L., Chuai S., Zhang R., Zeng J., Li M., Fan H., Lin Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 52. P. 21360–21365.
303. Knutson S.K., Warholc N.M., Wigle T.J., Klaus C.R., Allain C.J., Raimondi A., Porter Scott M., Chesworth R., Moyer M.P., Copeland R.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 19. P. 7922–7927.
304. Versteeg I., Sevenet N., Lange J., Rousseau-Merck M.F., Ambros P., Handgretinger R., Aurias A., Delattre O. // *Nature.* 1998. V. 394. № 6689. P. 203–206.
305. Kohashi K., Oda Y. // *Cancer Sci.* 2017. V. 108. № 4. P. 547–552.
306. Knutson S.K., Kawano S., Minoshima Y., Warholc N.M., Huang K.C., Xiao Y., Kadowaki T., Uesugi M., Kuznetsov G., Kumar N., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2014. V. 13. № 4. P. 842–854.
307. Konze K.D., Ma A., Li F., Barsyte-Lovejoy D., Parton T., Macnevin C.J., Liu F., Gao C., Huang X.P., Kuznetsova E., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 6. P. 1324–1334.
308. Fujita S., Honma D., Adachi N., Araki K., Takamatsu E., Katsumoto T., Yamagata K., Akashi K., Aoyama K., Iwama A., et al. // *Leukemia.* 2018. V. 32. № 4. P. 855–864.
309. Honma D., Kanno O., Watanabe J., Kinoshita J., Hirasawa M., Nosaka E., Shiroishi M., Takizawa T., Yasumatsu I., Horiuchi T., et al. // *Cancer Sci.* 2017. V. 108. № 10. P. 2069–2078.
310. Zhou Y., Du D.H., Wang J., Cai X.Q., Deng A.X., Nosjean O., Boutin J.A., Renard P., Yang D.H., Luo C., et al. // *Chem. Biol. Drug. Des.* 2020 May 11. doi: 10.1111/cbdd.13702. Online ahead of print.
311. Kasinath V., Faini M., Poepsel S., Reif D., Feng X.A., Stjepanovic G., Aebbersold R., Nogales E. // *Science.* 2018. V. 359. № 6378. P. 940–944.
312. Margueron R., Justin N., Ohno K., Sharpe M.L., Son J., Drury W.J., 3rd, Voigt P., Martin S.R., Taylor W.R., De Marco V., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7265. P. 762–767.
313. Kim W., Bird G.H., Neff T., Guo G., Kerenyi M.A., Walensky L.D., Orkin S.H. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 10. P. 643–650.
314. Khan M., Walters L.L., Li Q., Thomas D.G., Miller J.M., Zhang Q., Sciallis A.P., Liu Y., Dlouhy B.J., Fort P.E., et al. // *Lab. Invest.* 2015. V. 95. № 11. P. 1278–1290.
315. He Y., Selvaraju S., Curtin M.L., Jakob C.G., Zhu H., Comess K.M., Shaw B., The J., Lima-Fernandes E., Szewczyk M.M., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 4. P. 389–395.
316. Qi W., Zhao K., Gu J., Huang Y., Wang Y., Zhang H., Zhang M., Zhang J., Yu Z., Li L., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 4. P. 381–388.
317. Lai A.C., Crews C.M. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2017. V. 16. № 2. P. 101–114.
318. Ma A., Stratikopoulos E., Park K.S., Wei J., Martin T.C., Yang X., Schwarz M., Leshchenko V., Rialdi A., Dale B., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. № 2. P. 214–222.

УДК 577.152.342\*1'134

# Участие остатков E34, K35 и R38 N-домена в формировании функционально активной структуры Lon-протеазы *Escherichia coli*

А. Г. Андрианова<sup>1</sup>, А. М. Куджаев<sup>1</sup>, В. А. Абрикосова<sup>1</sup>, А. Е. Гущина<sup>2</sup>, И. В. Смирнов<sup>1</sup>, Т. В. Ротанова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Macromolecular Crystallography Laboratory NCI-Frederick, P.O. Box B, Frederick, MD 21702, USA

\*E-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

Поступила в редакцию 09.09.2020

Принята к печати 21.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11197

**РЕФЕРАТ** АТР-зависимая Lon-протеаза *Escherichia coli* (*EcLon*), относящаяся к суперсемейству AAA<sup>+</sup>-белков, является ключевым участником системы контроля качества клеточного протеома, в которой она отвечает за расщепление потенциально опасных для клетки мутантных, поврежденных и короткоживущих регуляторных белков. *EcLon* функционирует как гомоолигомер, субъединица которого включает центральный характеристический AAA<sup>+</sup>-модуль, С-концевой протеазный домен, а также N-концевую некаталитическую область, образованную двумя доменами – собственно N-концевым и вставочным α-спирализованным. Анализ пространственной структуры N-домена позволил выявить остатки E34, K35 и R38 на поверхности молекулы фермента, предположительно вовлеченные в формирование стабильной, функционально активной *EcLon*-протеазы. Получен тройной мутант LonEKR, несущий замены остатков E34, K35 и R38 на аланин. Показано, что введение указанных замен влияет на конформационную стабильность и межцентровые аллостерические взаимодействия в ферменте, обусловленные действием нуклеотидов, а также на формирование корректного сайта связывания белкового субстрата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** контроль качества клеточного протеома, AAA<sup>+</sup>-белки, АТР-зависимый протеолиз, LonA-протеазы, N-домен.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** AMPPNP – аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; Nu – нуклеотид; PепТВЕ – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Suc – сукцинил; ОП – оптическое поглощение.

## ВВЕДЕНИЕ

АТР-зависимые Lon-протеазы (MEROPS: клан SJ, семейство S16) – ключевые участники системы контроля качества клеточных белков, обеспечивающей сохранность протеома во всех царствах природы. Наряду с Lon и другими АТР-зависимыми протеазами система контроля качества (СКК) включает молекулярные шапероны, которые обеспечивают корректный фолдинг белков, отвечают за формирование белковых ансамблей и препятствуют накоплению агрегатов в клетке. В свою очередь АТР-зависимые протеазы и мультисубъединичные бифункциональные комплексы – протеасомы – деградируют поврежденные, мутантные, а также короткоживущие регуляторные белки, потенциально опасные для клетки [1–6].

Lon-протеазы – гомоолигомерные ферменты. Их субъединицы включают АТР-азный (AAA<sup>+</sup>) модуль, образованный нуклеотидсвязывающим (NB) и α-спирализованным (H) доменами, протеазный (P) домен, представляющий собой серин-лизиновую пептидгидролазу, а также N-концевой или инсерционный некаталитический экстрадомен (ED) (рис. 1) [7, 8].

Наличие AAA<sup>+</sup>-модуля в структуре Lon-протеаз, как и других протеаз СКК, определяет их принадлежность суперсемейству AAA<sup>+</sup>-белков (ATPases Associated with a variety of cellular Activities), широко распространенных в природе и участвующих в важнейших процессах, таких, как репликация ДНК, транскрипция, деление клеток, внутриклеточный транспорт, фолдинг, протеолиз и др. [9–12]. AAA<sup>+</sup>-протеазы – высокоселективные ферменты,

основными особенностями которых являются сопряжение протеолитической активности с гидролизом АТФ и процессивный характер гидролиза белковых мишеней, в результате которого образуются исключительно низкомолекулярные продукты (5–15 аминокислотных остатков, а.о.) [13–15].

Из множества клеточных белков АТФ-зависимые протеазы отбирают свои субстраты по наличию в них особых структурных элементов: экспонированных гидрофобных частей белковой молекулы либо меток, называемых дегронами. Дегроны представляют собой специфические аминокислотные последовательности, локализованные на конце или внутри полипептидной цепи субстрата [16–18]. Меткой для субстратов протеасом, функционирующих в клетках эукариот, служит белок убиквитин [19, 20]. Процессивный механизм гидролиза субстратов AAA<sup>+</sup>-протеазами реализуется благодаря бочкообразной четвертичной структуре этих ферментов. Их цилиндрические олигомеры используют энергию АТФ для связывания,

денатурации и транслокации белковых субстратов вдоль центральной поры, образованной уложенными друг на друга кольцами АТФ-азных модулей и протеазных доменов, к пептидазным центрам, скрытым внутри олигомера фермента [21–23].

На сегодняшний день в базе данных MEROPS из общего пула АТФ-зависимых Lon-протеаз выделены три подсемейства: А, В и С (рис. 1А). Основой для разделения ферментов Lon на подсемейства служат различия в окружении каталитически активных остатков серина и лизина протеолитических центров, а также локализация экстрадоменов, определяющая архитектуру АТФ-азного компонента [7, 8, 24]. В семействе Lon-протеаз идентифицировано два типа протеолитических центров – тип P<sub>A</sub>, обнаруженный в P-доменах ферментов самого крупного подсемейства LonA, объединяющего ферменты бактерий и эукариот [7, 8, 24, 25], и тип P<sub>B</sub>, детектируемый в ферментах подсемейства LonB из архей [8, 26], а также малочисленного бактериального подсемейства LonC (рис. 1А) [27, 28].

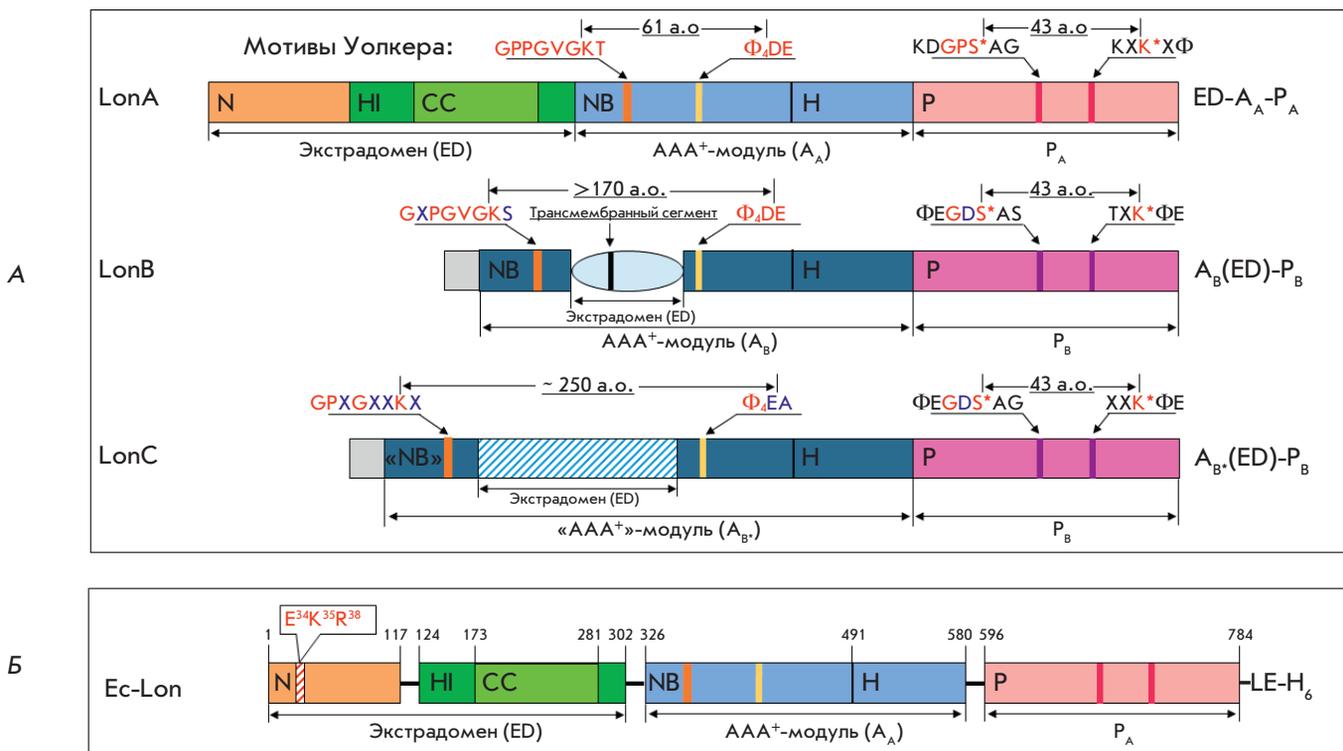


Рис. 1. Доменная организация Lon-протеаз из разных подсемейств (А) и границы доменов в субъединице Lon-протеазы *E. coli* (Б). А – S\* и K\* – каталитически активные остатки протеолитического центра, Φ – остаток гидрофобной аминокислоты, X – остаток любой аминокислоты, P<sub>A</sub> и P<sub>B</sub> – протеазные домены А-типа (розовый) и В-типа (фиолетовый), A<sub>A</sub>, A<sub>B</sub> и A<sub>B</sub>\* – AAA<sup>+</sup>-модули соответственно А-типа (голубой), В-типа и В\*-типа «вырожденный» (синие), NB – нуклеотидсвязывающие домены, H – α-спирализованные домены, ED – экстрадомены, представленные N-доменом (коричневый) и HI(CC) – вставочным α-спирализованным доменом (зеленый) с coiled-coil-участком (салатовый) у протеаз LonA, трансмембранным доменом (светло-голубой) у LonB и вставочным доменом (заштрихован) у LonC; а.о. – аминокислотный остаток; замены аминокислот в консервативных фрагментах выделены синим цветом. Б – субъединица LonA-протеазы *E. coli* с C-концевым 6His-тэгом; в N-доме заштрихован регион, включающий остатки E34, K35 и R38

Экстрадомен LonA-протеаз представлен пролонгированной N-концевой областью, являющейся отличительной особенностью представителей этого подсемейства. Протеазы LonB и LonC содержат инсерционные экстрадомены, локализованные в их нуклеотидсвязывающих доменах между мотивами Уолкера А и В. Особенностью экстрадомена ферментов LonB является наличие включенного в него трансмембранного сегмента. Экстрадомен LonC-протеаз отличает большая протяженность по сравнению с экстрадоменом LonB и вырождение АТФ-азной функции вследствие замены существенных остатков АТФ-азного центра (рис. 1А). Тем не менее, LonC-протеазы также участвуют в системе контроля качества протеома, поскольку регуляция их протеолитической активности опосредована сохранившейся способностью к связыванию нуклеотидов [27].

Наиболее изучены представители подсемейства LonA. Их N-концевая область имеет двухдоменную организацию [21, 29]. У LonA-протеазы *Escherichia coli* (EcLon) она включает 325 а.о. и сформирована «истинным» N-концевым (M1-Y117) и вставочным  $\alpha$ -спирализованным ( $\alpha$ -helical inserted, HI(CC), (E124-P302)) доменами (рис. 1Б) [29, 30]. Первый имеет структуру скрученного  $\beta$ -листа и топологически сходен с РНК-связывающими PUA-доменами [31, 32]. Второй, сформированный восемью  $\alpha$ -спиралями, включает участок последовательности со специфической coiled-coil (CC) конформацией и проявляет выраженное сходство с H-доменом собственного AAA<sup>+</sup>-модуля, а также с  $\alpha$ -спирализованным доменом первого AAA<sup>+</sup>-модуля шаперонов-дезагрегас ClpB/Hsp104, содержащим инсерционный M-домен с CC-конформацией [30, 31, 33].

К настоящему времени накоплен значительный объем сведений о роли AAA<sup>+</sup>-модуля и протеазного домена в функционировании LonA-протеаз. Однако функции N-концевой области LonA-протеаз охарактеризованы еще не в полной мере. Согласно опубликованным данным, эта область молекулы участвует в распознавании и связывании белков-субстратов [34–37]. Недавно было показано участие N-концевой области в образовании додекамерных структур из гексамеров LonA-протеазы *E. coli* [38, 39]. Кроме того, выявлено различие функций, выполняемых N- и HI(CC)-доменами в полномасштабной EcLon-протеазе [40–45], что служит подтверждением двухдоменной организации N-концевой области фермента. Совокупность результатов различных исследований указывает на важнейшую роль N-концевой области LonA-протеаз в поддержании их функционально активной конформации. При этом остается неясным, какие именно фрагменты N-домена важны

для структурной организации и принимают участие в стабилизации ферментов.

Цель настоящей работы состояла в выявлении остатков N-концевого домена, способных участвовать в формировании стабильной, функционально активной структуры EcLon-протеазы (далее – Lon-протеазы), проведении сайт-направленного мутагенеза этих остатков с получением мутантной формы фермента и последующем исследовании ее структурных и ферментативных характеристик в сравнении с соответствующими характеристиками интактной EcLon.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали коммерческие реактивы фирм Sigma, Bio-Rad, Thermo Scientific (США), Fluka, Bachem (Швейцария), Boehringer Mannheim (Германия), Pharmacia (Швеция), Difco (Англия), Panreac (Испания) и «Реахим» (Россия).

### Получение рекомбинантной EcLon-протеазы (Ec-Lon) и ее мутантной формы LonEKR

Рекомбинантную форму EcLon-протеазы, содержащую гексагистиридиновый фрагмент в составе октапептида LENNНННН на С-конце белка (Ec-Lon), получали по ранее описанной методике [40].

Тройной мутант LonEKR получали с помощью мегапраймерного подхода на основе нуклеотидной последовательности Ec-Lon-протеазы с использованием следующих праймеров: Lon\_E34K35R38/AAA, T7 promoter и f9 (5'-CCATCGCCGCTTCCAGACAAGCGATAGATGCTGCCCGCCCGACAAATAAGGGG-3', 5'-ТТААТАСГАСТСАСТАТАGGGGA-3' и 5'-CGTTTACACCCGGCTCATCC-3' соответственно). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET28-Ec-lon. На первом этапе с помощью праймеров Lon\_E34K35R38/AAA и T7 promoter получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе совместно с праймером f9. Полученный фрагмент ДНК длиной около 250 п.н. клонировали в вектор pET28-Ec-lon по уникальным сайтам рестрикции XbaI и HindIII.

Секвенирование клонированных ДНК и синтез праймеров осуществлены компанией «ЕВРОГЕН» ([www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)). Процедуры рестрикции и лигирования проводили согласно протоколам производителей соответствующих ферментов.

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), несущие плазмиду pET28-lonEKR, культивировали в среде LB с канамицином при 37°C и интенсивном перемешивании до достижения ОП<sub>600</sub> 0.5 о.е., после чего темпера-

туру клеточной культуры понижали до 25°C и проводили индукцию при 0.1/1 мМ IPTG в течение 3 ч.

Выделение и очистку EcLon и LonEKR проводили с использованием Ni<sup>2+</sup>-хелатной аффинной хроматографии (колонка HisTrap FF, 5 мл, GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии (колонка HiTrap™ Q FF, 5 мл, GE Healthcare) согласно ранее описанной методике [40], а также последующей двухстадийной гель-фильтрацией на HiPrep™ 16/60 Sephacryl S-300 HR (120 мл, GE Healthcare), буферы: 50 мМ имидазол, pH 7.5; 0.5 М NaCl (стадия 1) и 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 0.5 М NaCl (стадия 2).

Концентрации белков определяли по методу Брэдфорд [46].

Гомогенность белков в препаратах тестировали электрофоретически [47] с использованием коммерческого набора маркеров (кДа): β-галактозидаза (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназа (35.0), рестриктаза Bsp98I (25.0), β-лактальбумин (18.4) и лизоцим (14.4).

#### Определение энзиматических свойств EcLon и ее тройного мутанта LonEKR

*АТФ-азную активность* тестировали по накоплению во времени неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 2.5 мМ АТФ, 2.5 или 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0.1–1.0 мкМ фермент в отсутствие и при наличии β-казеина (1 мг/мл), при 37°C [48]. В контрольном опыте фермент заменяли буфером. Начальные скорости реакций определяли по величине ОП смеси из 200 мкл реакционной среды и 600 мкл реагента (100 мМ Zn(АсО)<sub>2</sub>, 15 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Мо<sub>7</sub>О<sub>24</sub>, 1% SDS, pH 4.5–5.0) при длине волны 350 нм ( $\epsilon_{350} = 7\ 360\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ).

*Тиоэстеразная активность.* За гидролизом тиобензилового эфира N-защищенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (ПерТВЕ) следили спектрофотометрически при длине волны 324 нм по величине ОП 4-тиопиридона ( $\epsilon_{324} = 16\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, BzIS<sup>-</sup>) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) [49]. Гидролиз ПерТВЕ проводили при 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 10% DMSO, 0.2 мМ DTDP, 0.1 мМ ПерТВЕ и 0.1–1.0 мкМ фермент. При изучении влияния эффекторов в смесь добавляли нуклеотид до 2.5 мМ и MgCl<sub>2</sub> до 20 мМ.

*Протеолитическую активность* ферментов тестировали электрофоретически [47]. Реакцию проводили при температуре 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере,

pH 8.1, содержащем 200 мМ NaCl, 20 мкМ β-казеин и 1 мкМ фермент, в отсутствие или при наличии 5 мМ Nu и 20 мМ MgCl<sub>2</sub>. В контрольном эксперименте фермент заменяли буфером. Аликвоту реакционной или контрольной смеси смешивали с лизирующим буфером (0.2 М Трис-НСl, pH 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 0.8% бромфеноловый синий, 3% β-меркаптоэтанол) в соотношении 3:1, кипятили в течение 5 мин, наносили на 12% ПААГ для электрофореза.

*Автолитическую активность* ферментов тестировали электрофоретически [47] в условиях, аналогичных условиям определения протеолитической активности, но в отсутствие β-казеина.

*Ограниченный протеолиз химотрипсином* EcLon-протеазы и ее тройного мутанта LonEKR проводили при температуре 30°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 8.1, содержащем 300 мМ NaCl, 11 мкМ фермент и 0.2 мкМ химотрипсин, в отсутствие и при наличии эффекторов EcLon-протеазы.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Идентификация остатков N-домена EcLon-протеазы, предположительно участвующих в формировании функционально активного фермента

Ранее нами было показано, что ключевая роль в корректном связывании белкового субстрата EcLon-протеазой, эффективном функционировании ее АТФ-азного и пептидазного центров, реализации межцентровых аллостерических взаимодействий и процессивного механизма протеолиза принадлежит инсерционному HI(CC)-домену [40–45]. При этом для взаимодействия с белковым субстратом и его гидролиза критически важными оказались фланкирующие CC-участок фрагменты (E124–H172) и (M281–N302) [41–43].

Нами установлено [44], что N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность EcLon-протеазы в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ, поскольку укороченная форма фермента (G107–K784), полученная в результате удаления фрагмента (M1–N106), подвергается интенсивному автолизу, несмотря на сохранение способности к процессивному протеолизу. Наряду с этим показано [34], что остатки R33, E34 и K35 N-концевого домена принимают участие в специфическом связывании субстратов EcLon, содержащих так называемый sul20-дегрон (фрагмент ингибитора клеточного деления SulA), что, в свою очередь, влияет на активность АТФ-азного и протеолитического центров.

В то же время результаты рентгеноструктурного анализа N-концевой области LonA-протеазы *E. coli* [31] позволяют предположить, что регион, включающий остатки R33, E34, K35, а также R38, может иметь важное значение для реализации междоменных и/или межсубъединичных взаимодействий в ферменте. Этот регион локализован на поверхности N-домена *EcLon*-протеазы (рис. 2), и, таким образом, указанные остатки могут быть непосредственно вовлечены как во взаимодействия с субстратом, так и во взаимодействия между протомерами внутри олигомеров *EcLon*. Предположение об участии рассматриваемого региона в формировании активной структуры и функционировании *EcLon* можно проверить путем изучения свойств мутантной формы фермента, несущей замены потенциально значимых остатков.

Однако, как следует из рис. 2, остаток R33 образует ионную пару с остатком E62, расположенным на конце длинной поверхностной петли из 18 остатков. Такое взаимодействие ограничивает подвижность этой петли и тем самым поддерживает ее конформацию. Предполагаемая мутация остатка R33 может привести к нарушению топологии исследуемой области. По этой причине в настоящей работе исследована мутантная форма *EcLon*-протеазы (LonEKR), в которой заменам на аланин были подвергнуты только три остатка, а именно, E34, K35 и R38.

#### Получение LonEKR – тройного мутанта Lon-протеазы *E. coli*

Мутантную форму LonEKR, содержащую замены E34A, K35A и R38A, получали на основе рекомбинантной формы *EcLon*, содержащей гексагистициновый фрагмент на C-конце белка (*EcLon*) [40]. Интактный фермент и его тройной мутант выделяли согласно схеме, включающей аффинную хроматографию на Ni-сефарозе, ионообменную хроматографию на Q-сефарозе и гель-фильтрацию на сефакриле S-300. Для интактного и мутантного ферментов определяли АТФ-азную, пептидазную, протеолитическую и автолитическую активность. При изучении гидролиза АТФ оценивали влияние избытка ионов магния и присутствия белкового субстрата. Пептидазную (субстрат – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, ПерТВЕ), протеолитическую (модельный белковый субстрат –  $\beta$ -казеин) и автолитическую активность тестировали в отсутствие и в присутствии эффекторов Lon-протеазы – нуклеотидов и ионов магния.

#### АТФ-азная активность мутантной формы LonEKR

Ранее было показано, что интактная *EcLon*-протеаза демонстрирует максимальный уровень АТФ-азной активности в реакционной среде с рН 8.0–8.2 и при эквимоллярных концентрациях АТФ

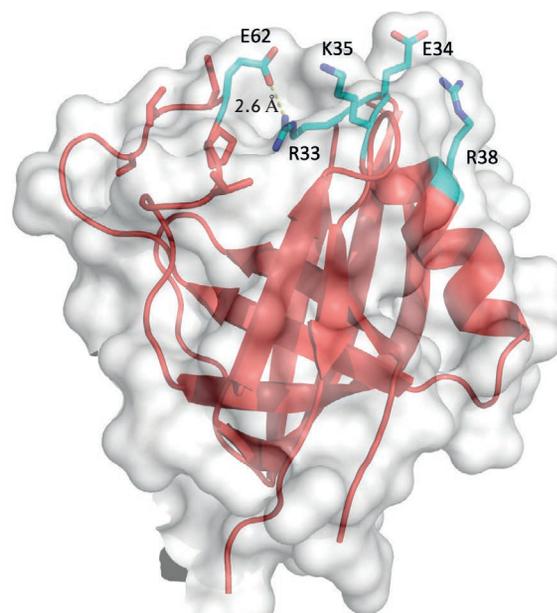
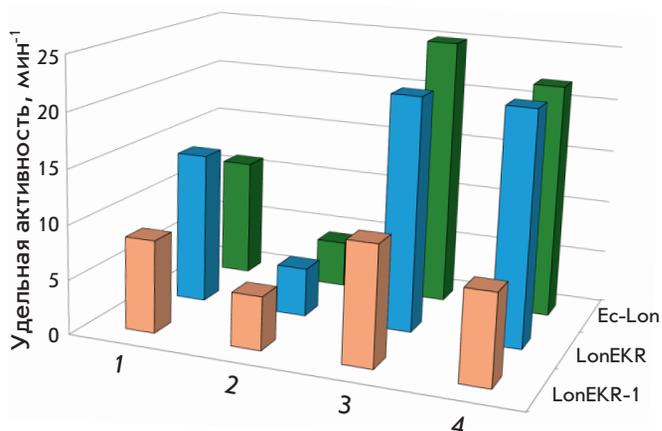


Рис. 2. Поверхность N-домена *EcLon*-протеазы (остатки 7–118). Красным цветом показаны элементы вторичной структуры, голубым – боковые цепи поверхностных остатков, желтым пунктиром обозначено ионное взаимодействие между остатками R33 и E62

и ионов магния, равных 2.5 мМ. При повышенной концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , характерной для физиологических условий (20 мМ), наблюдается понижение АТФ-азной активности. Присутствие белкового субстрата способно восстанавливать скорость гидролиза АТФ до значений, соответствующих оптимальным условиям ее проявления [40, 43].

Тройной мутант *EcLon*-протеазы по эффективности гидролиза АТФ близок к интактному ферменту, при этом сохраняются особенности его функционирования, в том числе ингибирование избытком ионов магния и последующая активация АТФ-азных центров  $\beta$ -казеином (далее – казеин). Однако активация центров мутантной формы в ответ на взаимодействие с казеином происходит с меньшей эффективностью, чем у интактной *EcLon*-протеазы (рис. 3), что может быть обусловлено ослаблением связывания белковой мишени вследствие введения мутаций по остаткам E34, K35 и R38.

В отдельном эксперименте показано влияние условий культивирования штамма-продуцента, в частности условий индукции, на эффективность функционирования АТФ-азных центров выделенной формы фермента LonEKR. При работе с *EcLon*-протеазой и ее модифицированными формами в качестве оптимальных были приняты условия, понижающие влияние краудинг-эффекта в процессе экспрессии целевого гена: ферментацию проводили в присутствии 0.1 мМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида

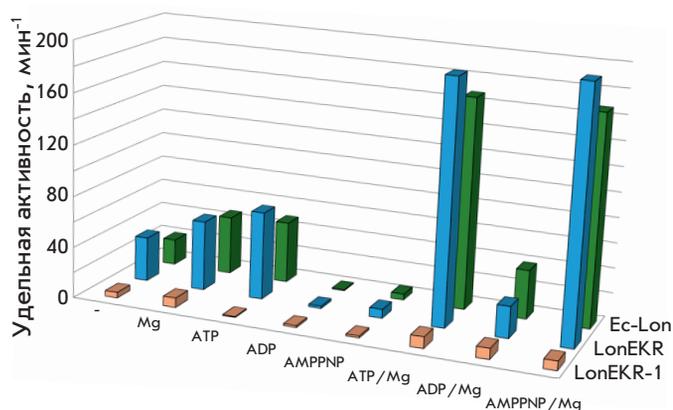


**Рис. 3.** АТФ-азная активность интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантных форм *LonEKR* и *LonEKR-1*. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C. Концентрации: АТФ – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 2.5 (1, 3) или 20 мМ (2, 4); β-казеин – 0 (1, 2) или 1 мг/мл (3, 4); фермент – 0.1–1.0 мкМ. Величина среднеквадратичного отклонения R<sup>2</sup> в экспериментах составила 0.98–1.00

(IPTG) и температуре 25°C. В случае увеличения концентрации индуктора до 1 мМ наблюдалось понижение базовой АТФ-азной активности выделенного мутанта (*LonEKR-1*) на 40% по сравнению с интактным ферментом (рис. 3). Эффективность восстановления АТФ-азной активности *LonEKR-1* при взаимодействии с белковым субстратом также оказалась заметно ниже, чем у интактной *Lon*-протеазы и формы *LonEKR* (рис. 3). Таким образом, можно полагать, что присутствие IPTG в концентрации 1 мМ неблагоприятно влияет на фолдинг мутантной формы *Ec-Lon*-протеазы, что также подтверждается экспериментами по гель-фильтрации *LonEKR-1*, в ходе которой наблюдаются изменения в характере белкового пика по сравнению с *Lon* и *LonEKR* – расширение пика и появление у него «хвоста».

#### Активность пептидазного центра мутантной формы *LonEKR*

Эффективность функционирования пептидазных центров интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантной формы *LonEKR* оценивали по гидролизу тиобензилового эфира N-защищенного трипептида – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (PerTBE) [40]. При гидролизе пептидного субстрата в отсутствие нуклеотидных эффекторов мутантная форма *LonEKR* оказалась более эффективной (в 1.7 раза), чем интактная *Lon* (рис. 4). При этом ионы магния активируют пептидазные центры обеих форм в незначительной мере. Среди свободных нуклеотидов лишь АТФ проявляет слабое, но близкое по эффективности активирующее действие, в то время как ADP и AMPPNP в одина-



**Рис. 4.** Пептидазная активность интактной *Ec-Lon*-протеазы и ее мутантных форм *LonEKR* и *LonEKR-1*. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 10% DMSO; 0.2 мМ DTDP; 37°C. Концентрации: PerTBE – 0.1 мМ; нуклеотиды – 2.5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; фермент – 0.1–1.0 мкМ. Величина среднеквадратичного отклонения R<sup>2</sup> в экспериментах составила 0.98–1.00

ковой мере ингибируют пептидазную активность, что свидетельствует о сходном сродстве нуклеотидов с интактной и мутантной формами фермента. Наибольшее активирующее влияние на пептидазные центры обеих форм *Lon* оказывают комплексы АТФ/Мг и АМППNP/Мг (рис. 4). Таким образом, можно констатировать, что пептидгидролазные центры тройного мутанта ведут себя, в целом, подобно центрам интактного фермента.

Полученные результаты позволяют считать, что введение мутаций по остаткам E34, K35 и R38 N-концевого домена *EcLon* не приводит к значительным изменениям функционирования пептидазных центров фермента. Однако, поскольку активация интактной *Lon* комплексами АТФ/Мг и АМППNP/Мг заметно превышает активацию ими формы *LonEKR*, можно полагать, что у мутанта изменяется передача аллостерических сигналов от АТФ-азного центра к пептидазному, возможно, за счет различий в эффективности связывания комплексов Nu/Mg.

Необходимо отметить, что форма фермента *LonEKR-1*, полученная в результате экспрессии гена мутантной формы *Lon*-протеазы в присутствии 1 мМ IPTG, проявляет резко пониженную пептидазную активность относительно активности формы *LonEKR* (рис. 4). В отсутствие эффекторов гидролиз низкомолекулярного субстрата формой *LonEKR-1* протекает в 8 раз медленнее, чем формой *LonEKR*, но при этом сохраняется активирующий эффект ионов магния. В отличие от действия на *LonEKR* любые свободные нуклеотиды ингибируют пептидазную активность *LonEKR-1*, а их комплексы с Mg<sup>2+</sup> ускоряют

гидролиз пептида в среднем только в 2 раза, что мало отличается от действия ионов магния. Таким образом, как и в случае с АТФ-азной активностью, полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что проведение индукции в присутствии 1 мМ IPTG приводит к значительным конформационным нарушениям в структуре фермента, что сказывается на его функциональной активности.

### Протеолитическая активность и автолитические свойства мутантной формы LonEKR

Протеолитическую активность *Ec*-Lon-протеазы и ее мутантной формы оценивали по гидролизу  $\beta$ -казеина (рис. 5) как в [40–45]. Форма LonEKR сохраняет характерную для ферментов СКК способность гидролизовать белковую мишень по процессивному механизму (без высвобождения крупных промежуточных продуктов) в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ (рис. 5Б). Этот механизм реализуется гексамерной структурой LonEKR, образование которой подтверждено экспериментами по гель-фильтрации (данные не приведены). В присутствии комплекса АТФ/Мg за первые 10 мин реакции более 50% казеина подвергается деградации мутантной формой, что сопоставимо с известной эффективностью АТФ-зависимого гидролиза этого субстрата нативной *Ec*Lon-протеазой [43]. Интактный фермент характеризуется также способностью деградировать белковый субстрат в присутствии комплекса негидролизуемого аналога АТФ, АМPPNP, с ионами магния. Продуктами реакции в этом случае являются высокомолекулярные фрагменты, т.е. протеолиз происходит по непроцессивному механизму и с низкой эффективностью (рис. 5А). Ионы магния отдельно также можно рассматривать в качестве активаторов непроцессивного гидролиза казеина *Ec*-Lon-протеазой (рис. 5А). В противоположность интактному ферменту протеолитическая активность тройного мутанта LonEKR в присутствии как ионов магния, так и комплекса АМPPNP/Мg за тот же период времени практически не проявляется (рис. 5Б). Полученные результаты могут отражать как ухудшение эффективности связывания белкового субстрата с LonEKR, так и нарушения аллостерических взаимодействий между АТФ-азным и протеолитическим центрами в мутантном ферменте.

Из рис. 5 следует, что в отсутствие эффекторов, а также при наличии ионов магния взаимодействие фермента с белковым субстратом сопровождается выраженным автолизом интактной Lon-протеазы и слабым автолизом мутанта. Изучение автолитической функции нативной и мутантной форм Lon в отсутствие белка-мишени показало, что за исследуемый интервал времени (36 ч – для Lon и 33 ч –

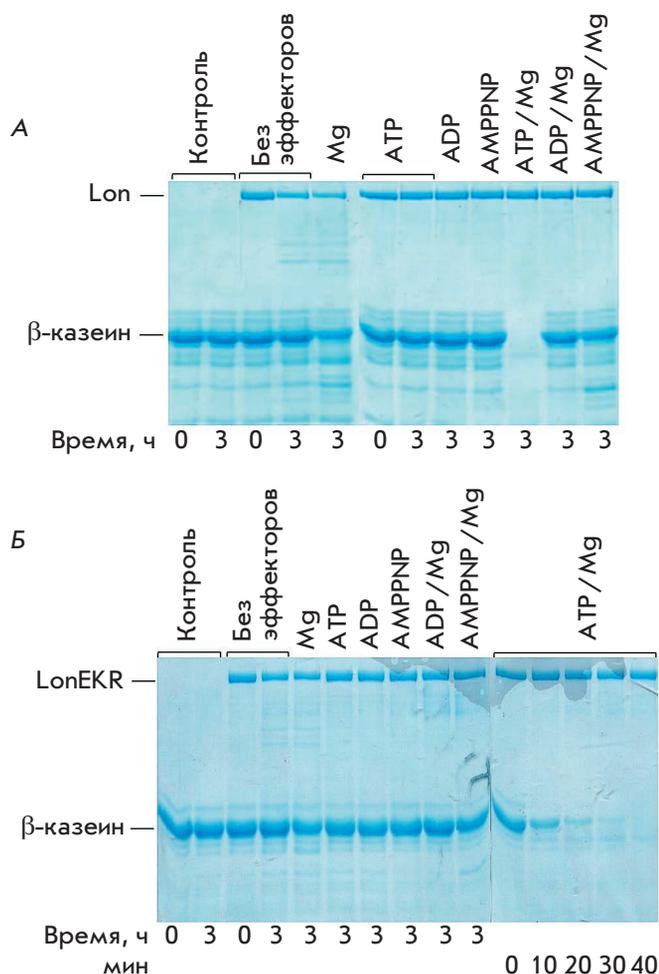
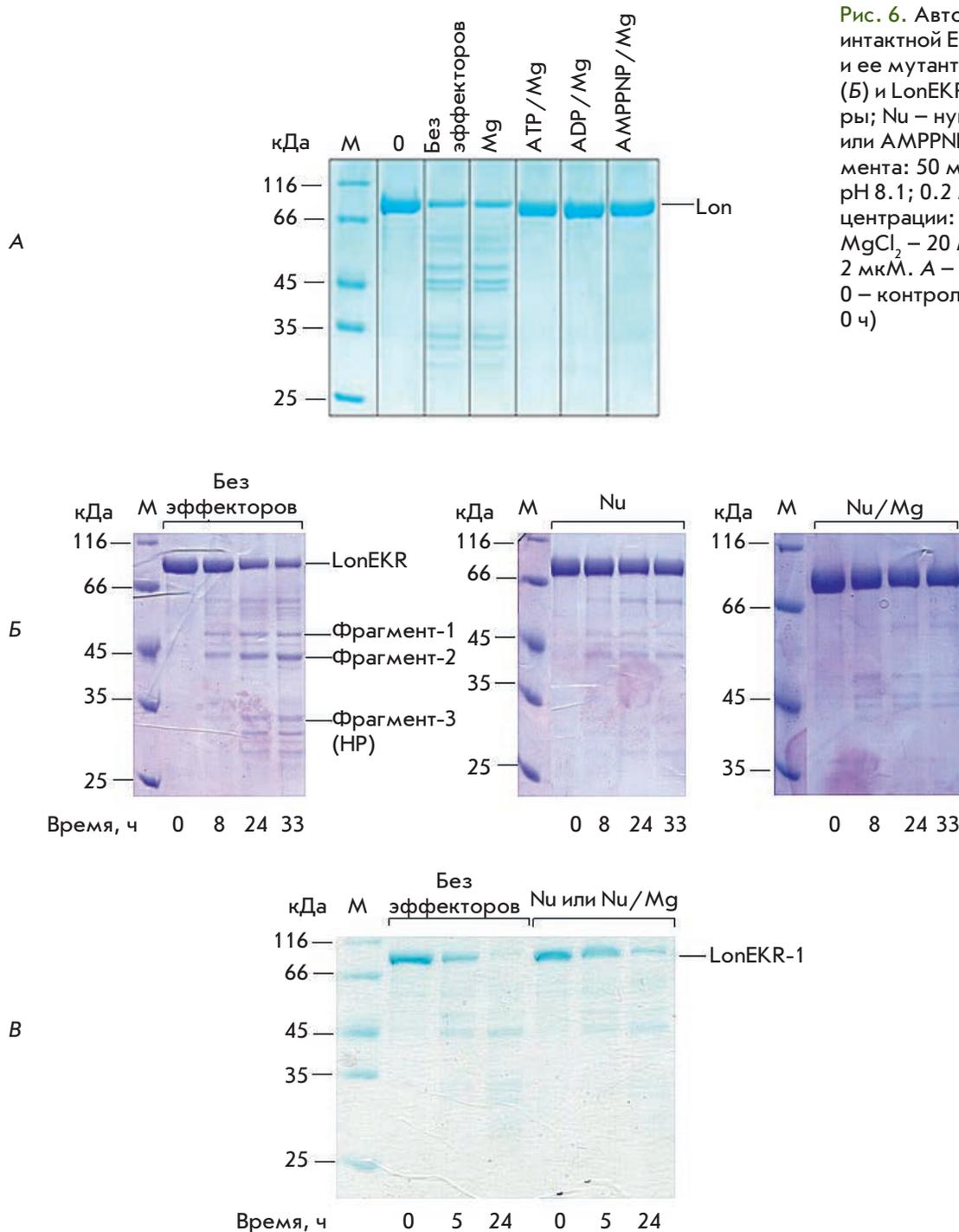


Рис. 5. Гидролиз  $\beta$ -казеина *Ec*-Lon-протеазой (А) и ее мутантной формой LonEKR (Б) в отсутствие и в присутствии эффекторов (электрофорез в 12% ПААГ). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C; концентрации:  $\beta$ -казеин – 20 мкМ; нуклеотиды – 5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; фермент – 1 мкМ

для LonEKR) количество обеих форм фермента значительно уменьшается (рис. 6А, Б). При этом автолиз интактной Lon наблюдается исключительно в отсутствие нуклеотидных эффекторов, в то время как автолиз мутанта LonEKR происходит при любых условиях, однако нуклеотиды и их комплексы с ионами магния заметно стабилизируют мутантную форму фермента.

С помощью N-концевого секвенирования установлено, что стабильные фрагменты LonEKR образуются в результате автолиза фермента по связям, локализованным во вставочном HI(CC)-домене (F138–E139 и M234–K235), а также на границе NB- и H-доменов (L490–S491) (рис. 1Б и 7). Продуктами автолиза по связям F138–E139 и M234–K235 являются соответственно Фрагмент-1 с молекулярной массой около 50 кДа и Фрагмент-2 около 44 кДа (рис. 6Б).



**Рис. 6.** Автолитические свойства интактной Ec-Lon-протеазы (А) и ее мутантных форм LonEKR (Б) и LonEKR-1 (В). М – маркеры; Nu – нуклеотид (АТР, АDР или АМРPNP). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 8.1; 0.2 М NaCl; 37°C. Концентрации: нуклеотиды – 5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; фермент – 2 мкМ. А – время реакции 36 ч; 0 – контроль (время реакции – 0 ч)

В этих продуктах отщеплены, по-видимому, также С-концевые части последовательности LonEKR (предположительно Р-домены). Автолитическое расщепление тройного мутанта по связи L490–S491 приводит к образованию Фрагмента-3 (33 кДа), включающего Н- и Р-домены (рис. 6Б и 7).

Стабильные фрагменты нативной Lon-протеазы образуются при автолизе, происходящем в NB-домене по связям M410–A411 и I488–R489, и исключительно

в отсутствие нуклеотидных эффекторов [43] (рис. 7). В последнем случае так же, как и у LonEKR, образуется фрагмент, включающий α-спирализованный и протеазный домены (НР), мол. масса которого соответствует 33 кДа. Таким образом, результаты автолиза свидетельствуют о различии конформаций интактной Lon-протеазы и ее тройного мутанта LonEKR, а также о возможном влиянии введенных мутаций на эффективность связывания комплексов Nu/Mg.

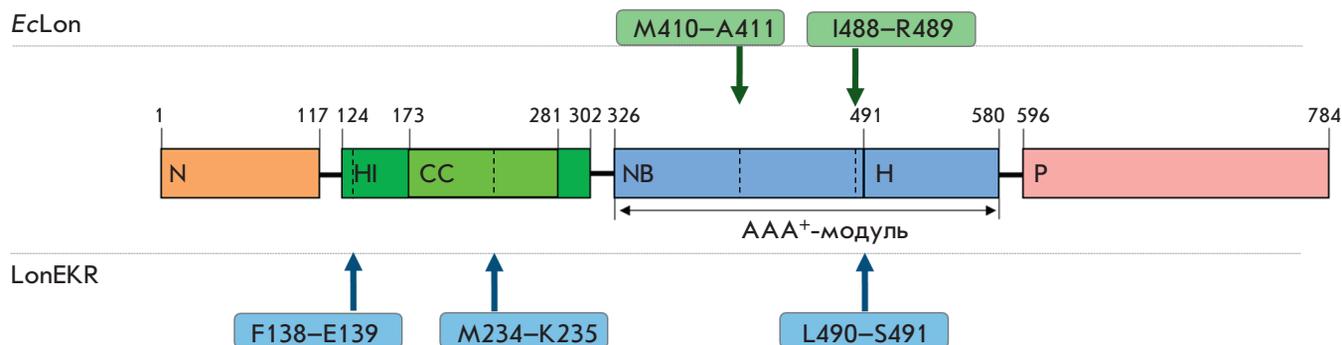


Рис. 7. Локализация сайтов автолиза в нативной *Eclon*-протеазе и в мутантной форме *LonEKR*

Расщепление нативного фермента по связи M234–K235, расположенной в характеристической «длинной спирали» СС-участка, тоже возможно, но такой характер деградации имеет место только при ограниченном протеолизе *Lon* химотрипсином в присутствии нуклеотидов или комплексов Nu/Mg [50]. Таким образом, можно констатировать, что связи M234–K235 и L490–S491 (или I488–R489) локализованы в областях субъединицы *Lon*, доступных воздействию различных протеаз. Однако расщепление по связи F138–E139, которая находится в N-концевой α-спирали HI(CC)-домена, до сих пор не обнаружили ни в нативной *Lon*-протеазе, ни в каких-либо ее модифицированных формах.

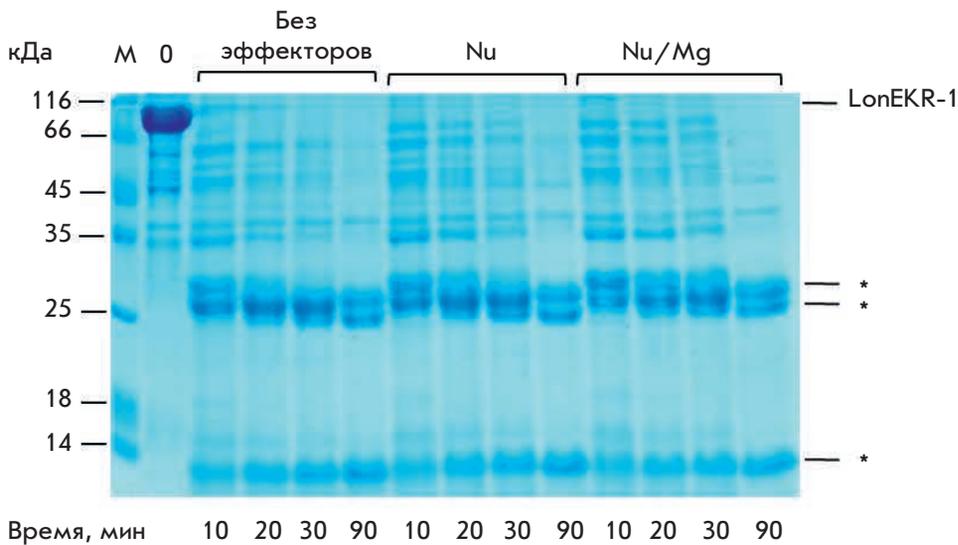
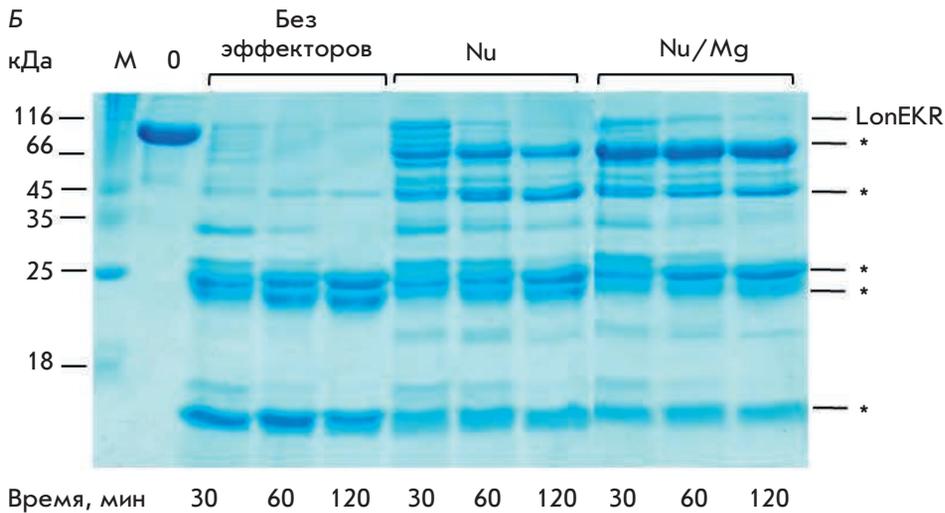
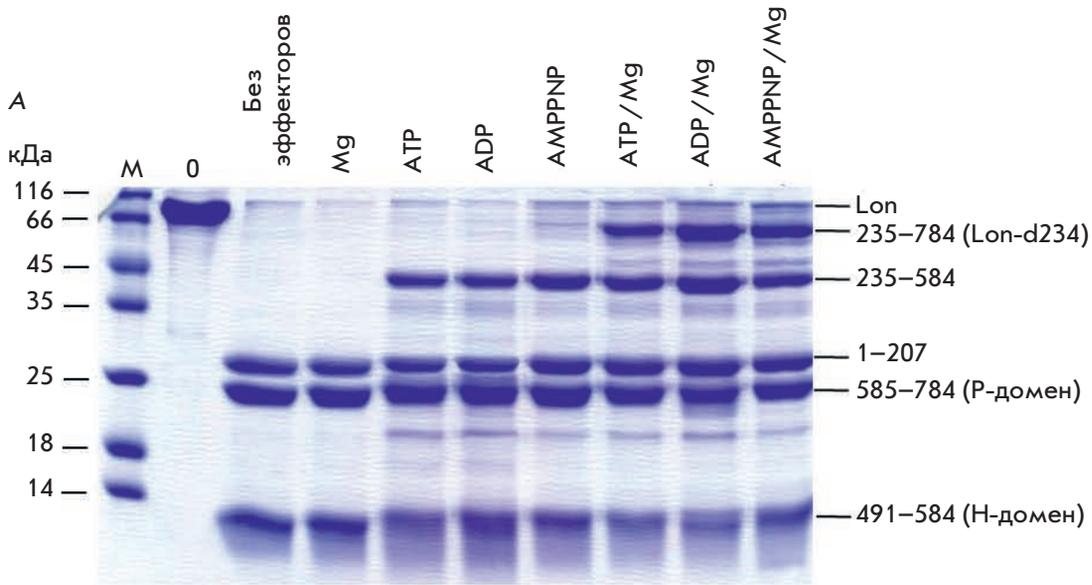
Сайты автолиза в HI(CC)-домене (а.о. 124–302), не характерные для интактной *Lon*-протеазы, ранее нашли в трех укороченных по N-концевому домену формах фермента в присутствии комплекса АТФ/Mg. Так, форма *Lon*-d106, утратившая первые 106 а.о., в этих условиях подвергается интенсивному расщеплению по связи A267–K268, локализованной на N-конце последней спирали СС-участка [44]. Поскольку *Lon*-d106 – единственная укороченная форма, которая сохраняет способность к АТФ-зависимому процессивному гидролизу белкового субстрата, сделано заключение о том, что N-домен *Lon*-протеазы не участвует в реализации механизма процессивного протеолиза, но его присутствие обеспечивает конформационную стабильность фермента в классических условиях его функционирования [44]. Форма *Lon*-d172, не содержащая первых 172 остатков, также нестабильна в присутствии комплекса АТФ/Mg и подвергается автолизу по связи D245–D246 (центральная часть СС-участка) [43]. Полученный методом ограниченного протеолиза фрагмент *Lon*-протеазы *Lon*-d234 (а.о. 235–784) тоже проявляет повышенную автолитическую активность в условиях сопряжения с гидролизом АТФ: 50%-ный автолиз наблюдается уже через 20 мин, при этом расщепление происходит непосредственно после СС-участка, по связи A286–E287 [50].

Таким образом показано, что введение трех мутаций в N-концевой домен *Lon*-протеазы приводит к заметной дестабилизации фермента и вызывает конформационные изменения, которые обуславливают экспонирование в среду скрытого в нативной структуре региона, включающего N-концевую часть α-спирализованного HI(CC)-домена.

Следует отметить, что эти особенности *LonEKR* становятся еще более очевидными, когда индукция мутантного гена происходит в условиях, неоптимальных для данного фермента (1 мМ IPTG). Полученная таким путем мутантная форма *LonEKR*-1 подвергается практически полному автолизу за сутки независимо от присутствия нуклеотидов или нуклеотид-магниевого комплекса в реакционной смеси (рис. 6B).

Для дальнейшей характеристики конформационной стабильности *Lon*-протеазы и ее мутантной формы *LonEKR* использовали также метод ограниченного протеолиза химотрипсином. Характер химотрипсинолиза нативной *Lon*-протеазы является эффектор-зависимым [50]. В отсутствие эффекторов образуются лишь N-концевой фрагмент (1–207), P- и H-домены, тогда как присутствие нуклеотида ведет к стабилизации центрального NB-домена и, как результат, к образованию добавочного фрагмента (235–584), включающего AAA<sup>+</sup>-модуль и, кроме того, часть HI(CC)-домена (235–302) с линкером (303–325) (рис. 8A). Продукты химотрипсинолиза *Lon*-протеазы схематически представлены на рис. 9. Присутствие нуклеотид-магниевого комплекса стабилизирует область между АТФ-азным модулем и протеазным доменом, что приводит к образованию фрагмента (235–784), упоминаемого выше как *Lon*-d234 (рис. 8A и 9).

Ограниченный протеолиз формы *LonEKR* химотрипсином происходит подобным же образом (рис. 8A и B), и можно полагать, что образующиеся при этом фрагменты не отличаются от продуктов химотрипсинолиза интактного фермента. Однако в случае формы *LonEKR*-1, полученной при 1 мМ IPTG, образование стабильных фрагментов последовательности, вклю-



**Рис. 8.** Химотрипсинолиз нативной *EcLon*-протеазы (А) и мутантных форм *LonEKR*-1 (Б) и *LonEKR*-1 (В). М – маркеры; 0 – образец реакционной смеси в начальный момент времени; Nu – нуклеотид (АТФ, АДФ или АМРРNP). \* – Продукты химотрипсинолиза мутантных форм *LonEKR* и *LonEKR*-1, N-концы которых не подтверждены секвенированием. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСI-буфер; рН 8.1; 0.3 М NaCl; 30 °С. Концентрации: *EcLon* (*LonEKR* или *LonEKR*-1) – 11 мкМ; нуклеотиды – 5 мМ; MgCl<sub>2</sub> – 20 мМ; химотрипсин – 0.2 мкМ. А – время реакции 2 ч

чающих NB-доменов, не зафиксировано ни в присутствии нуклеотидов, ни в присутствии их комплексов с ионами магния (рис. 8B). Результаты химотрипсинализа, свидетельствующие о том, что нуклеотиды и нуклеотид-магниевые комплексы не стабилизируют структуру мутантной формы LonEKR-1, полностью согласуются с данными по автолизу этой формы. Таким образом, индукция гена *lonEKR* (1 mM IPTG) является причиной формирования нестабильной конформации фермента LonEKR-1, что приводит к его быстрому автолитическому расщеплению в условиях эксперимента.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее мы установили, что N-концевой домен обеспечивает конформационную стабильность *EcLon*-протеазы. В настоящей работе на основании рентгеноструктурных данных было предложено тестировать роль остатков E34, K35 и R38 N-домена в качестве остатков, участвующих в поддержании стабильной функциональной структуры фермента посредством межсубъединичных и/или междоменных взаимодействий. Показано, что замены этих остатков на аланин с образованием тройного мутанта LonEKR не приводят к значительным изменениям в характере функционирования АТФ-азных и пептидгидролазных центров фермента, но вызывают ухудшение связывания белкового субстрата.

Как и нативный фермент, мутантная форма LonEKR образует гексамерные структуры, однако вопрос о возможности формирования мутантных додекамеров остается открытым. При этом форма LonEKR сохраняет главное свойство АТФ-зависимых протеаз – способность к процессивной деградации белка-мишени при сопряжении протеолиза с гидролизом АТФ, несмотря на детектируемое нарушение межцентровых аллостерических взаимодействий. Вместе с тем, в отличие от интактного фермента, форма LonEKR в некоторой степени дестабилизирована введенными заменами, поскольку нуклеотиды и их комплексы с ионами магния, являющиеся стабилизаторами структуры Lon-протеазы, не способны полностью предотвратить автолитическое расщепление мутанта.

Следует особо подчеркнуть, что ключевую роль в формировании стабильной структуры функционально активной Lon-протеазы играют индукция гена и последующий фолдинг белковой молекулы в условиях краудинг-эффекта. Форма LonEKR-1, полученная при относительно высокой концентрации индуктора (1 mM IPTG), совсем не стабилизируется нуклеотидами и проявляет повышенную скорость автолиза по сравнению с интактной Lon и формой LonEKR.

Таким образом, в настоящей работе установлено, что остатки E34, K35 и R38 N-концевого домена *EcLon*-протеазы влияют на формирование кор-

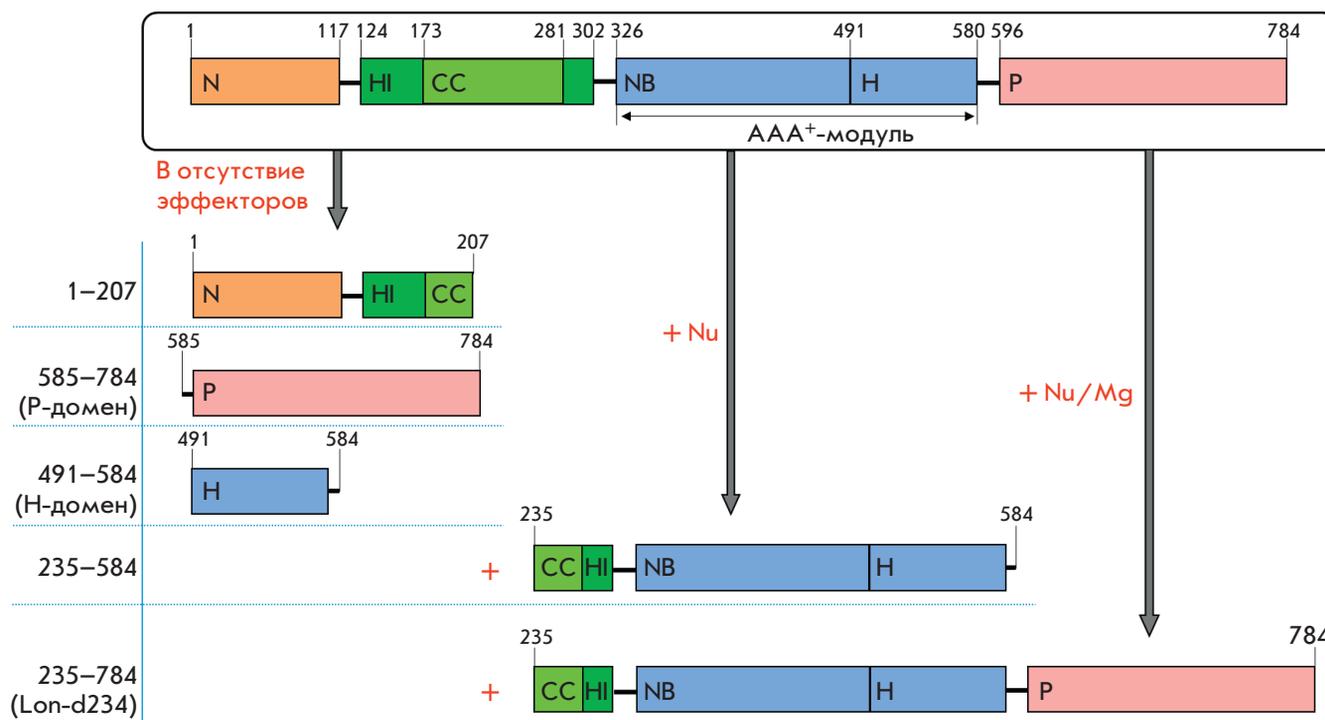


Рис. 9. Схема строения продуктов ограниченного протеолиза Lon-протеазы *E. coli* химотрипсином

ректного сайта связывания белкового субстрата, вовлечены в превращения фермента, вызываемые взаимодействием с нуклеотидами, и участвуют в поддержании конформационной стабильности фермента. Предполагаемое участие изучаемых остатков в образовании додекамерных форм *EcLon*-протеазы может служить задачей предстоящего структурного исследования мутанта *LonEKR*. ●

*Авторы выражают благодарность Ю.Ф. Леоновой за проведение N-концевого секвенирования фрагментов EcLon-протеазы и мутантной формы LonEKR.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00646).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 815–823.
- Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 3. P. 120–125.
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 777–788.
- Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // *Science.* 2016. V. 353 (6294). aac4354.
- Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsai F.T.F. // *F1000Research.* 2015. V. 4. (F1000 Faculty Rev). 1448.
- Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // *Annu. Rev. Biochem.* 2016. V. 85. P. 715–742.
- Ротанова Т.В., Цирульников К.Б., Мельников Э.Э. // *Био-орган. химия.* 2003. Т. 29. С. 97–99.
- Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4865–4871.
- Steinman J.B., Kapoor T.M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019. V. 50. P. 45–54.
- Miller J.M., Enemark E.J. // *Archaea.* 2016. V. 2016. P. 1–12.
- Puchades C., Sandate C.R., Lander G.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 43–58.
- White S.R., Lauring B. // *Traffic.* 2007. V. 8. P. 1657–1667.
- Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. // *Biopolymers.* 2016. V. 105. P. 505–517.
- Striebel F., Kress W., Weber-Ban E. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009. V. 19. P. 209–217.
- Gottesman S. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 19. P. 565–587.
- Anthony J.R., Steven E.G. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 873–885.
- Baker T.A., Sauer R.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. P. 647–653.
- Gur E., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 18503–18508.
- Ciechanover A., Stanhill A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 86–96.
- Lopez-Castejon G. // *FEBS J.* 2020. V. 287(1). P. 11–26.
- Sauer R.T., Baker T.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 587–612.
- Gur E., Vishkautzan M., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. P. 268–278.
- Francis T.T., Christopher P.H. // *eLife.* 2020. V. 9. P. 1–3.
- Rotanova T.V., Botos I., Melnikov E.E., Rasulova F., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // *Protein. Sci.* 2006. V. 15. P. 1815–1828.
- Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J.E., Khalatova A.G., Rasulova F., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8140–8148.
- Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V., Tropea J.E., Gustchina A., Rotanova T.V., Wlodawer A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. P. 144–157.
- Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C., Yang C.Y., Wu W.L., Chang W.H., Liaw Y.C., Lin L.H., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7(7). P. 1–13.
- Liao J.H., Ihara K., Kuo C.I., Huang K.F., Wakatsuki S., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. P. 1395–1402.
- Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. С. 412–419.
- Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорган. химия.* 2013. Т. 39. С. 309–319.
- Li M., Gustchina A., Rasulova F., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. // *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 865–873.
- Bertonati C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., et al // *Proteins.* 2009. V. 75. P. 760–773.
- Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *FEBS OpenBio.* 2019. V. 9. P. 1536–1551.
- Wohlever M.L., Baker T.A., Sauer R.T. // *Mol. Microbiol.* 2014. V. 91. P. 66–78.
- Rudiyak S.G., Shrader T.E. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 1810–1817.
- Adam C., Picard M., Déquard-Chablat M., Sellem C.H., Hermann-Le Denmat S., Contamine V. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. 1–10.
- Ebel W., Skinner M.M., Dierksen K.P., Scott J.M., Trempey J.E. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2236–2243.
- Botos I., Lountos G.T., Wu W., Cherry S., Ghirlando R., Kudzhaev A.M., Rotanova T.V., de Val N., Tropea J., Gustchina A., Wlodawer A. // *Curr. Res. Struct. Biol.* 2019. V. 1. P. 13–20.
- Vieux E.F., Wohlever M.L., Chen J.Z., Sauer R.T., Baker T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 2002–2008.
- Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2014. Т. 40. С. 673–681.
- Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2018. Т. 44. С. 522–532.
- Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Ротанова Т.В. // *Acta Naturae.* 2017. Т. 9. № 2. С. 79–86.
- Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2017. Т. 43. С. 357–366.
- Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2016. Т. 42. С. 421–430.
- Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 579–586.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
- Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 254–258.
- Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 99. P. 53–64.
- Melnikov E.E., Andrianova A.G., Morozkin A.D., Stepanov A.A., Makhovskaya O.V., Botos I., Gustchina A., Wlodawer A., Rotanova T.V. // *Acta Biochim. Pol.* 2008. V. 55. P. 281–296.

УДК 616.379-008.64: 612.34: 57.084.1

# Упрощенная стрептозотоциновая модель сахарного диабета у мышей Nude

И. Г. Гвазава<sup>1,3</sup>, А. В. Косых<sup>1,3</sup>, О. С. Роговая<sup>1,3</sup>, О. П. Попова<sup>2</sup>, К. А. Собянин<sup>3</sup>, А. К. Хрущев<sup>3</sup>, А. В. Тимофеев<sup>3\*</sup>, Е. А. Воротеяк<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва, 125367 Россия

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

\*E-mail: alvaltim@gmail.com

Поступила в редакцию 14.09.2020

Принята к печати 02.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11202

**РЕФЕРАТ** В доклинических исследованиях биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для трансплантационной терапии сахарного диабета типа 1, обязательно используют различные модели, в частности, стрептозотоциновые модели диабета у мышей. Эти модели должны быть фенотипически и патогенетически адекватными, т.е. должны имитировать клинические и метаболические проявления сахарного диабета типа 1 и быть сходными с этим заболеванием по механизмам патогенеза. Кроме того, поскольку биомедицинские клеточные продукты содержат клетки человека, моделировать диабет приходится на животных с иммунодефицитом. Нами описана максимально упрощенная стрептозотоциновая модель диабета у мышей Nude. Диабет индуцировали у 31 самца однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в 0.9% NaCl в дозе 150 мг/кг веса. Контрольным мышам (14 особей) вводили 0.9% NaCl. На протяжении 50 дней после введения стрептозотоцина периодически измеряли концентрацию глюкозы в плазме ( $K_{гп}$ ) не натощак. Ни одна мышь не погибла на протяжении всего срока наблюдения. Через 15 дней после введения стрептозотоцина у 22 из 31 (71%) мышей развился стабильный диабет (критерии стабильного диабета:  $K_{гп} \geq 15$  ммоль/л при всех измерениях и отсутствие ремиссии болезни). У мышей со стабильным диабетом средняя  $K_{гп}$  за 35 дней равнялась 25.7 ммоль/л. На 50-й день средняя концентрация инсулина в плазме, среднее содержание инсулина в поджелудочной железе и среднее количество  $\beta$ -клеток в островках Лангерганса у мышей со стабильным диабетом были соответственно в 2.6, 8.4 и 50 раз меньше, чем у контрольных животных. Мы считаем, что наша модель диабета у мышей Nude фенотипически и патогенетически адекватна и может использоваться в доклинических испытаниях антидиабетических биомедицинских клеточных продуктов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** модель, мыши Nude, сахарный диабет, стрептозотоцин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БМКП – биомедицинский клеточный продукт; ВБТТГ – внутрибрюшинный тест на толерантность к глюкозе;  $K_{гп}$  – концентрация глюкозы в плазме; ПЖ – поджелудочная железа; СД1 – сахарный диабет типа 1; СТЗ – стрептозотоцин.

## ВВЕДЕНИЕ

За два последних десятилетия достигнуты немалые успехи в создании биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для трансплантационной терапии сахарного диабета типа 1 (СД1) [1]. Доклинические испытания таких БМКП обязательно включают оценку их антидиабетического (сахаропонижающего) эффекта на моделях диабета у животных. Наиболее популярны стрептозотоциновые модели диабета у мышей, что объясняется простотой, невысокой стоимостью и,

главное, патогенетической и фенотипической адекватностью этих моделей [2, 3]. Под патогенетической адекватностью понимается сходство механизмов развития стрептозотоцинового диабета у мышей и СД1 у человека: в обоих случаях болезнь обусловлена разрушением  $\beta$ -клеток и, как следствие, дефицитом инсулина. Под фенотипической адекватностью понимается сходство проявлений стрептозотоцинового диабета и СД1: у мышей развивается гипергликемия, резко уменьшается количество  $\beta$ -клеток в островках

Лангерганса, наблюдаются полиурия, полидипсия и потеря веса, падает жизнеспособность.

Есть два основных метода индукции стрептозотоцинового диабета у мышей: многократное введение низких доз стрептозотоцина (СТЗ) (40–60 мг/кг веса животного) на протяжении 4–5 дней либо однократное введение средних или высоких доз (100–250 мг/кг); первый метод несколько эффективней, но требует больших трудозатрат [2]. СТЗ вводят внутрибрюшинно или внутривенно – в одну из хвостовых вен либо (самцам) в вену полового члена. При внутрибрюшинном введении не исключены случайные проколы кишечника, что приводит к смерти животных, а возможное попадание СТЗ не в брюшинную полость, а в подкожную ткань ослабляет диабетогенное действие СТЗ [4]. Тем не менее внутрибрюшинное введение СТЗ, в силу своей простоты, применяется гораздо чаще, чем внутривенное.

Структурно и конформационно сходный с глюкозой СТЗ проникает в  $\beta$ -клетки мышшей с помощью глюкозного транспортера GLUT2. Поскольку СТЗ конкурирует с глюкозой за захват этим транспортером, для повышения эффективности индукции диабета рекомендуется перед введением СТЗ не кормить животных в течение как минимум 4 ч [5]. Однако Chaudhry и соавт. в экспериментах на мышшах C57BL/6 и NOD/SCID показали, что эффективность индукции диабета одинакова при введении СТЗ натощак и не натощак [6]. Введение СТЗ не натощак более предпочтительно, так как при этом исключается стресс, обусловленный голоданием.

Традиционно считается, что СТЗ быстро теряет активность в растворах с нейтральным pH, поэтому во многих протоколах индукции стрептозотоцинового диабета рекомендуется растворять СТЗ в цитратном буфере с pH 4–4.5 [5, 7]. Даже небольшой объем цитратного буфера с такими низкими значениями pH может вызвать раздражение брюшины и существенный сдвиг кислотно-щелочного равновесия. Поэтому многие исследователи используют для растворения СТЗ нейтральные среды – фосфатный солевой буфер, сбалансированный солевой раствор Хэнка, 0.9% NaCl [4, 6, 8].

Необходимо отметить, что после введения больших доз СТЗ (> 200 мг/кг) у мышшей быстро развиваются дегидратация (обусловленная гипергликемией и общим токсическим действием СТЗ) и тяжелая гипогликемия (обусловленная массивным высвобождением инсулина из разрушающихся  $\beta$ -клеток). Для коррекции водно-электролитных нарушений животным подкожно вводят солевые растворы, а для купирования гипогликемии дают раствор сахарозы [5, 9]. Эти меры не нужны при использовании меньших доз СТЗ.

Изучение антидиабетического действия БМКП на мышшах с диабетом сопряжено с рядом трудностей:

- для проявления эффекта БМКП обычно требуется довольно большое время: от недель до месяцев. На протяжении этих сроков у мышшей должен сохраняться стабильный диабет, т.е. частота спонтанной ремиссии болезни должна быть как можно меньше;

- уровень глюкозы в крови у мышшей с диабетом должен быть намного выше, чем у интактных животных. Только в этом случае можно с уверенностью выявить эффект БМКП;

- для исследования влияния разных доз БМКП и/или разных способов их трансплантации требуется много групп животных со стабильным диабетом, причем численность каждой группы должна обеспечивать статистическую надежность результатов. Поэтому эффективность индукции диабета (заболеваемость) должна быть максимальной, а смертность мышшей с диабетом – минимальной;

- увеличение дозы СТЗ для повышения эффективности индукции диабета ведет к росту смертности мышшей. Смертность удается уменьшить с помощью постоянной терапии небольшими дозами инсулина [9, 10], однако это усложняет работу с животными и затрудняет оценку эффектов БМКП;

- любой БМКП содержит клетки человека, ксеногенные по отношению к мышсам-реципиентам. Поэтому в исследованиях антидиабетических БМКП приходится использовать животных, толерантных к ксеноантигенам, в частности мышшей Nude. Данные о пригодности мышшей Nude для моделирования диабета с помощью СТЗ довольно противоречивы. Некоторые исследователи считают, что эти мышши, в силу их генетической уязвимости, особенно уязвимы для токсического действия СТЗ [7]. Другие доказывают, что мышши Nude вполне подходят для создания стрептозотоциновых моделей диабета, но все же прибегают к инсулинотерапии для повышения выживаемости животных [9].

Целью нашей работы был поиск максимально простой и надежной модели диабета у мышшей Nude. Основная проблема, которую требовалось разрешить перед началом работы, заключалась в выборе дозы СТЗ. Анализ опубликованных данных показал, что у мышшей Nude из разных питомников стабильный диабет удавалось индуцировать путем однократного введения СТЗ в дозах от 160 до 240 мг/кг, однако при использовании таких доз наблюдали значительную смертность животных: от 7 до 100% на протяжении 30 дней после введения СТЗ [4, 9, 11, 12]. В связи с этим было решено использовать меньшую дозу СТЗ. В предварительных экспериментах на мышшах C57BL/6 мы установили, что у этих животных СТЗ в дозе 150 мг/кг обеспечивает приемлемую заболе-

ваемость диабетом и почти стопроцентную выживаемость (неопубликованные данные). Именно такую дозу мы применили для индукции диабета у мышей Nude.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

Использовали самцов мышей Nude Cr1:NU(NCr)-Foxn1<sup>nu</sup>; возраст 15–18 недель, средний вес  $31.5 \pm 3.3$  г; питомник Charles River (Германия). Все работы с мышами выполняли в виварии барьерного типа. Животные получали стерилизованные корм и воду *ad libitum* и содержались при температуре 20–25°C и фоторежиме «12 ч света : 12 ч темноты». Работы проводили с разрешения Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных РНИМУ им. Н.И. Пирогова от 27.03.2019 в соответствии с европейской Директивой по охране лабораторных животных 2010/63/EU.

### Метод индукции диабета

Животных разделили на две группы – опытную (D,  $n = 31$ ) и контрольную (C,  $n = 14$ ). У мышей группы D индуцировали диабет однократным внутрибрюшинным введением СТЗ (Sigma S0130, США) в дозе 150 мг/кг; за 4 ч до введения мышам лишали корма. СТЗ растворяли в холодном 0.9% NaCl непосредственно перед введением, объем инъекции составлял 450–550 мкл. Мышам группы C вводили 0.9% NaCl.

### Методы оценки диабетогенного действия СТЗ

У всех животных определяли  $K_{ггг}$  не натощак до введения СТЗ (в нулевой день), на 8-й, 10-й дни и далее каждые 5 дней вплоть до 50-го дня после введения СТЗ, между 13:00 и 15:00. Для измерения  $K_{ггг}$  использовали глюкометр Contour TS и соответствующие тест-полоски (Bayer, Швейцария; регистрационные удостоверения Росздравнадзора 2007/00570 и 2008/01121). Работоспособность глюкометра и тест-полосок периодически проверяли с помощью контрольных растворов Contour с низкой, нормальной и высокой концентрацией глюкозы. Кровь для измерений  $K_{ггг}$  брали из надразов кончика хвоста. При  $K_{ггг} > 33.3$  ммоль/л на дисплее глюкометра отображался символ High. В таких случаях  $K_{ггг}$  считали равной 33.3 ммоль/л.

Диагноз диабета устанавливали при  $K_{ггг} \geq 15$  ммоль/л при двух последовательных измерениях (например, на 8-й и 10-й дни). Диабет считали стабильным, если  $K_{ггг} \geq 15$  ммоль/л регистрировалась при всех измерениях с 15-го по 50-й день наблюдения. Ремиссию диабета констатировали, если хотя бы

при одном измерении в период с 40-го по 50-й дни наблюдения  $K_{ггг}$  была меньше 15 ммоль/л.

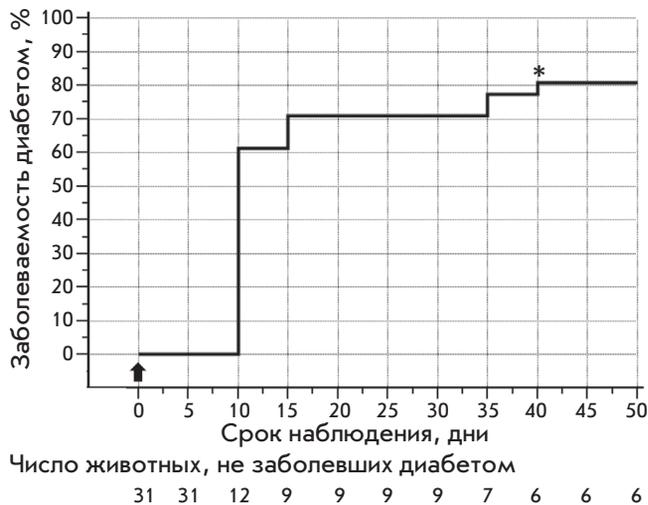
На 50-й день у мышей группы D со стабильным диабетом и у мышей группы C провели внутрибрюшинный тест на толерантность к глюкозе (ВБТТГ). Глюкозу вводили в дозе 2 г/кг, в 500 мкл 0.9% NaCl. На 0-й минуте (перед введением глюкозы), 15-й и 60-й минутах теста мышам наркотизировали изофлураном (Baxter Healthcare Corporation, США), проводили торакотомию и брали 200–400 мкл крови из камер сердца шприцем с иглой 25G в пробирку с гепаринатом лития (Microvette 500-LH, Sarstedt, Германия). В цельной крови измеряли  $K_{ггг}$ , затем пробу центрифугировали и измеряли уровень инсулина в плазме методом ИФА (тест-система 10-1249-01, Mercodia, Швеция). После взятия крови мышам умерщвляли цервикальной дислокацией.

Одновременно с взятием крови на 0-й минуте ВБТТГ у мышам забирали поджелудочную железу (ПЖ) и делили ее на три фрагмента. Первый фрагмент фиксировали в 10% нейтральном формалине (BioVitrum, Россия), заключали в парафин и готовили срезы толщиной 4–5 мкм. Срезы инкубировали с антителами мыши к инсулину 035K4884 (1 : 1000; Merck/Sigma, США). Инсулинпозитивные клетки выявляли с использованием набора реагентов EnVision FLEX (Agilent/Dako K8000, Дания). Второй фрагмент замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы (4 мкм). Эти срезы последовательно инкубировали с антителами кролика к инсулину ab181547 (1 : 200; Abcam, Великобритания) и с антителами против иммуноглобулинов кролика (1 : 500; Invitrogen Alexa Fluor Plus 488, A32790; ThermoFisher Scientific, США) и покрывали защитной средой с флуоресцентным красителем ядер DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium, H-1200, Vector Laboratories, США). Иммуноморфологические исследования проводили под микроскопом Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония). Третий фрагмент ПЖ использовали для оценки содержания инсулина в ткани ПЖ. Этот фрагмент подсушивали, взвешивали, измельчали ножницами в минимальном объеме воды и обрабатывали ультразвуком. Из полученной суспензии экстрагировали инсулин смесью этанола и соляной кислоты [13]; концентрацию инсулина в экстракте измеряли методом ИФА и нормировали на вес фрагмента.

В начале и в конце срока наблюдения измеряли вес мышам всех групп.

### Методы обработки и статистического анализа данных

Использовали программу MedCalc Statistical Software (version 19.4.0, MedCalc Software Ltd,



**Рис. 1.** Заболеваемость диабетом в группе D (анализ методом Каплана–Мейера). Стрелкой указан момент введения СТЗ. Звездочкой отмечено начало ремиссии у одного из животных

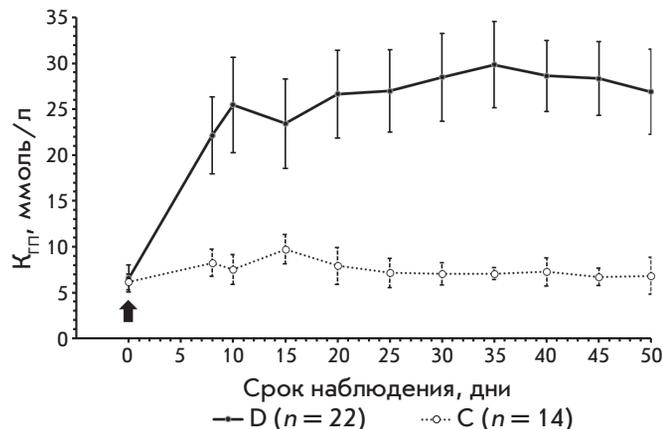
Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020). Нормальность распределения данных проверяли методом Шапиро–Уилка. Межгрупповые различия при нормальном распределении данных и однородности их дисперсий анализировали с использованием двустороннего *t*-теста Стьюдента, при нормальном распределении данных и неоднородных дисперсиях – *t*-теста Уэлча. Во всех случаях уровень значимости различий выбирали равным 5% ( $\alpha$ -ошибка 0.05). Для оценки заболеваемости применили графический метод Каплана–Мейера. Результаты измерений  $K_{ГП}$ , веса животных, уровней инсулина в плазме и содержания инсулина в ПЖ в тексте представлены в виде средних и стандартных отклонений с указанием 95-процентных доверительных интервалов для средних, на рисунках – в виде средних и стандартных отклонений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Эффективность индукции диабета

За весь срок наблюдения диабет развился у 25 мышей группы D (рис. 1), однако стабильный диабет наблюдался только у 22 животных. Таким образом, эффективность индукции стабильного диабета составила 71%. У одной из мышей с поздним развитием диабета вскоре произошла ремиссия; ни у одной мыши со стабильным диабетом ремиссии не было. Медиана заболеваемости равнялась 10 (10–15) дням. Ни одно животное в группе D не погибло на протяжении 50 дней после введения СТЗ.

Наши данные об эффективности индукции диабета и выживаемости трудно сравнивать с результата-



**Рис. 2.** Динамика  $K_{ГП}$  у мышей группы D со стабильным диабетом и у мышей группы C на протяжении всего срока наблюдения. Стрелкой указан момент введения СТЗ

ми других исследований, поскольку в них использовали мышей Nude из иных питомников и применяли иные дозы СТЗ. Например, Deeds и соавт. проводили эксперименты на мышах из питомника Taconic Farms (США). После введения СТЗ в дозе 220 мг/кг у 92.5% животных уже на 5-й день развился тяжелый диабет, но при этом смертность к 20-му дню составила 20% [4]. В исследовании Graham и соавт. у мышей из питомника Charles River (США) стабильный диабет развился на 5-й день после введения 240 мг/кг СТЗ, а смертность к 30-му дню составила всего 8%. Однако такая низкая смертность была обусловлена тем, что животные на протяжении всего срока исследования получали инсулинотерапию [9]. В работе Zhao и соавт. эффективность индукции диабета у мышей из питомника Shanghai Slacass (Китай) на 8-й день после введения 200 мг/кг СТЗ составила 100%, но все мыши погибли на 30-й день [12]. Таким образом, наша «среднедозовая» модель диабета уступает «высокодозовым» моделям в эффективности индукции болезни, но выгодно отличается от них по такому важнейшему показателю, как выживаемость животных.

### Динамика $K_{ГП}$

Гипергликемия в диабетическом диапазоне ( $K_{ГП} \geq 15$  ммоль/л) наблюдалась у мышей группы D со стабильным диабетом, начиная с 8-го дня после введения СТЗ (рис. 2). Средние групповые  $K_{ГП}$  за весь срок наблюдения у мышей группы D со стабильным диабетом и у мышей группы C составили  $25.7 \pm 3.5$  (24.1–27.2) и  $7.5 \pm 0.3$  (7.1–7.8) ммоль/л, а площади под кривыми  $K_{ГП}$  за весь срок наблюдения составили  $1258 \pm 172$  (1184–1332) и  $365 \pm 13$  (349–382) ммоль/л  $\times$  50 дней соответственно, в обоих случаях  $P < 0.0001$ ;

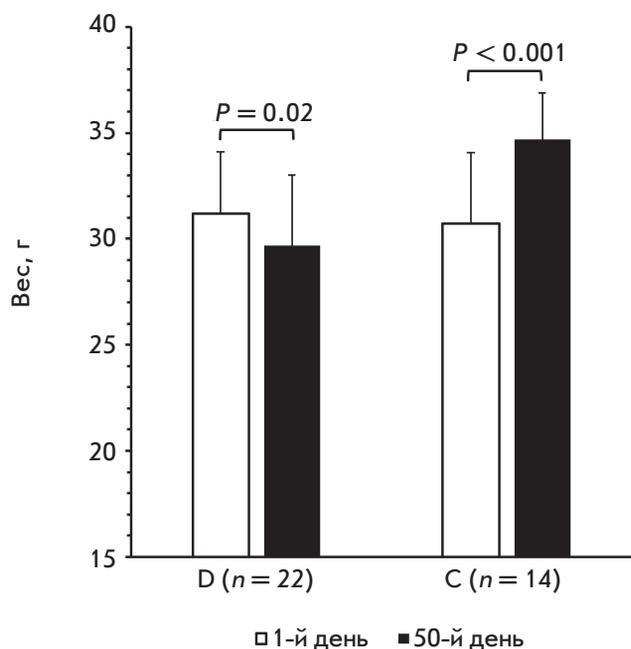


Рис. 3. Вес мышей группы D со стабильным диабетом и мышей группы C в начале и в конце срока наблюдения

*t*-тест Стьюдента. Наши результаты оценки  $K_{ГП}$  в группах D и C близки к результатам Deeds и соавт. [4]. В этом исследовании у мышей Nude средняя  $K_{ГП}$  не натошак в норме составляла  $7.7 \pm 1.1$  ммоль/л, а через 7 дней после введения СТЗ повысилась до  $28.6 \pm 5.3$  ммоль/л и сохранялась на этом уровне в течение 20 дней.

#### Изменения веса мышей

К концу срока наблюдения у мышей со стабильным диабетом вес снизился в среднем на  $4.8 \pm 0.9\%$ , тогда как в группе C вес увеличился на  $13 \pm 5.8\%$  (рис. 3). Потеря веса у грызунов со стрептозотоциновым диабетом многократно описана и не нуждается в обсуждении.

#### Результаты внутрибрюшинного теста на толерантность к глюкозе (ВБТТГ)

Базальные уровни инсулина (на 0-й минуте ВБТТГ) у мышей группы D со стабильным диабетом были в 2.6 раза ниже, чем у мышей группы C, и составляли  $67 \pm 17$  (49–85) и  $174 \pm 31$  (141–207) пмоль/л соответственно;  $P < 0.0001$ ; *t*-тест Стьюдента (рис. 4).

Площади под кривыми уровня глюкозы у мышей со стабильным диабетом и у интактных мышей составляли  $1870 \pm 108$  (1757–1982) и  $996 \pm 160$  (827–1163) ммоль/л  $\times$  60 мин; площади под кривыми уровня инсулина составляли  $3770 \pm 849$  (2879–

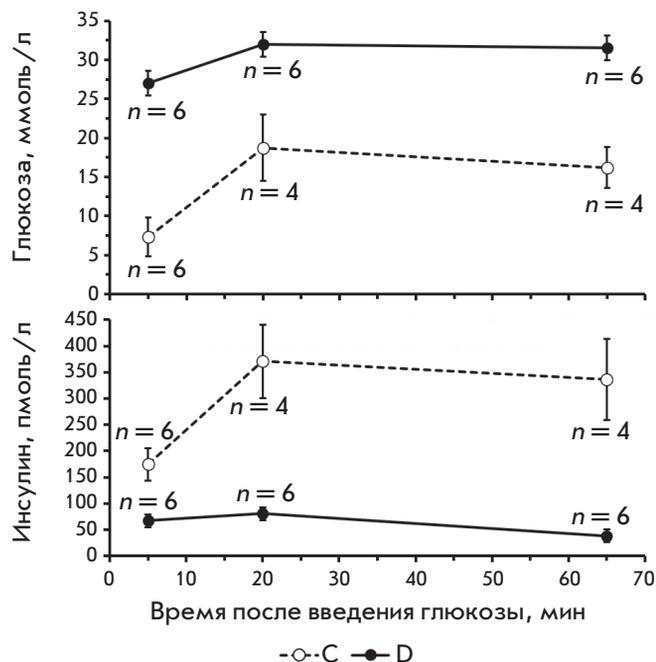


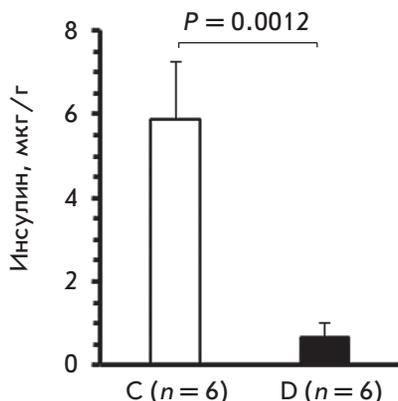
Рис. 4. Изменения  $K_{ГП}$  и уровней инсулина в плазме крови мышей группы D со стабильным диабетом и мышей группы C при ВБТТГ

4661) и  $20008 \pm 4052$  (15755–24260) пмоль/л  $\times$  мин соответственно; в обоих случаях  $P < 0.0001$ ; *t*-тест Стьюдента.

Наблюдавшаяся нами динамика  $K_{ГП}$  и уровней инсулина при ВБТТГ у интактных мышей Nude была сходна с динамикой этих показателей в аналогичных тестах, проводившихся как на мышках Nude, так и на мышках иных линий. Так, в работе Christoffersson и соавт. максимальная  $K_{ГП}$  у интактных мышей Nude, зарегистрированная через 15 мин после внутрибрюшинного введения глюкозы в дозе 2.5 мг/кг, составляла примерно 17 ммоль/л, а площадь под кривой уровня глюкозы равнялась примерно  $800$  ммоль/л  $\times$  60 мин [14]. Harper и соавт. показали, что у интактных беспородных мышей из разных питомников уровни инсулина на 0-й минуте варьировали между 120 и 200 пмоль/л, а максимальные уровни инсулина регистрировались на 15-й минуте после введения глюкозы и варьировали между 165 и 280 пмоль/л [15].

В нашей работе у мышей со стабильным диабетом уровни инсулина в плазме были довольно существенными на всех сроках ВБТТГ. Следовательно, даже на фоне тяжелого диабета у мышей Nude сохраняется некоторое количество функционально активных  $\beta$ -клеток. Остаточная секреция инсулина наблюдается и у больных СД1 на протяжении нескольких лет после клинического проявления болезни [16]. Таким

**Рис. 5.** Содержание инсулина в ПЖ мышей группы D со стабильным диабетом и у мышей группы C на 50-й день наблюдения



образом, наличие инсулина в плазме мышей группы D со стабильным диабетом подтверждает фенотипическое сходство нашей модели диабета с СД1.

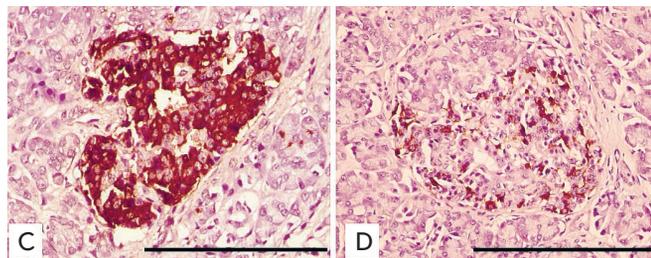
#### Содержание инсулина в поджелудочной железе

На 50-й день наблюдения среднее содержание инсулина в ПЖ мышей группы D со стабильным диабетом и у мышей группы C составляло соответственно  $0.7 \pm 0.3$  (0.2–1.1) и  $5.9 \pm 0.6$  (4.2–7.7) мкг/г веса железы,  $P < 0.0001$ , *t*-тест Уэлча (рис. 5).

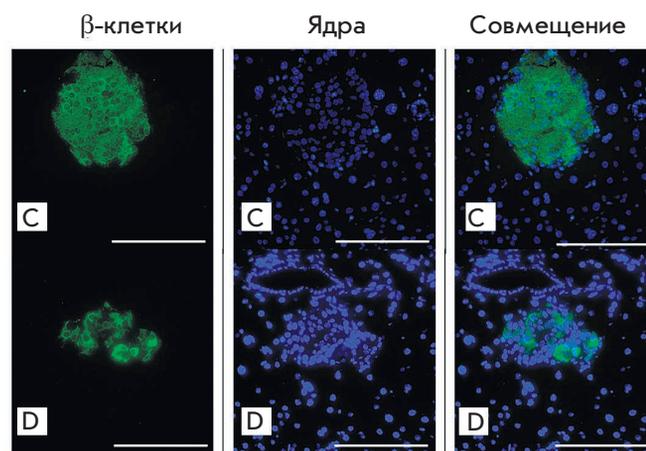
Согласно опубликованным данным, содержание инсулина в ПЖ мыши колеблется в широких пределах: у здоровых животных – от 2.5 до 80 мкг/г, у животных со стрептозотоциновым диабетом – от 0.2 до 20 мкг/г веса ПЖ [3, 8, 12]. Такая вариабельность объясняется межлинейными, возрастными и половыми различиями животных, разной длительностью и тяжестью диабета, разнообразием материала (целая ПЖ, отдельные доли ПЖ) и методов экстракции инсулина. Но в конечном счете при оценке степени повреждения  $\beta$ -клеток важны не абсолютные количества инсулина в ПЖ больных и здоровых животных, а соотношение этих количеств. Например, в нашей работе содержание инсулина в ПЖ мышей со стабильным диабетом на 50-й день после введения СТЗ было в 8.9 раза меньше, чем у интактных животных, а в исследовании Zhao и соавт. на 25-й день после введения СТЗ в дозе 200 мг/кг содержание инсулина в ПЖ мышей с диабетом было в 18 раз меньше, чем у здоровых животных [12].

#### Патоморфологические исследования ПЖ

К 50-му дню наблюдения у животных со стабильным диабетом сильно снизилась численность  $\beta$ -клеток в островках, появились очаги интра- и периинсулярного склероза (рис. 6). Путем прямого подсчета  $\beta$ -клеток (рис. 7) мы уточнили, что их количество в островках мышей со стабильным диабетом уменьшается примерно в 50 раз по сравнению с контролем. Подобная патоморфологическая картина типична



**Рис. 6.** Островки ПЖ мышей группы C и мышей группы D со стабильным диабетом на 50-й день наблюдения. Световая микроскопия, иммунопероксидазное окрашивание на инсулин,  $\times 400$ . Масштабный отрезок = 100 мкм



**Рис. 7.** Островки мышей группы C и мышей группы D со стабильным диабетом на 50-й день наблюдения. Флуоресцентная микроскопия,  $\times 200$ .  $\beta$ -Клетки: окрашивание на инсулин; ядра: окрашивание DAPI. Масштабный отрезок = 100 мкм

для диабета у мышей, индуцированного однократным введением средней или большой дозы СТЗ [4, 12].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перечислим достоинства нашей модели диабета:

- использование мышей Nude позволяет трансплантировать животным ксеногенные БМКП, содержащие клетки человека;
- максимальное упрощение методики индукции диабета: СТЗ вводится однократно внутривентриально;
- поскольку для растворения СТЗ используется 0.9% NaCl, а не буферный раствор с низким pH, исключено раздражение брюшины и снижен общетоксический эффект СТЗ;
- эффективность индукции диабета составляет примерно 71%, при этом выживаемость животных равна 100%. Это дает возможность формировать несколько опытных групп мышей с численностью, достаточной для получения статистически надежных экспериментальных результатов;

- использование средневысоких доз СТЗ не требует коррекции водно-электролитного баланса и поддерживающей инсулинотерапии;
- стабильный диабет сохраняется в течение длительного времени: с 15-го по 50-й день после введения СТЗ. Этот срок достаточен для оценки антидиабетического эффекта БМКП;
- измерения  $K_{ГП}$  проводятся не натощак. Тем самым у животных исключен стресс, обусловленный длительным голоданием;
- у животных со стабильным диабетом  $K_{ГП}$  намного выше, чем у контрольных животных, и нет спонтанной ремиссии болезни, что упрощает оценку антидиабетического эффекта БМКП;
- модель фенотипически и патогенетически сходна с СД1 у человека;
- модель позволяет проводить биохимические, гормональные и патоморфологические исследова-

ния, необходимые для оценки антидиабетического эффекта БМКП.

Мы считаем, что наша модель диабета у мышей Nude вполне подходит для доклинических испытаний антидиабетических БМКП и удобна для исследователей. Единственный недостаток нашей модели – сравнительно невысокая эффективность индукции диабета. Это обстоятельство нужно учитывать при расчете исходного количества животных. ●

*Исследование выполнено при поддержке гранта  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации  
(соглашение № 075-15-2020-773).*

*Конфликт интересов: авторы заявляют  
об отсутствии конфликта интересов.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loretelli C., Assi E., Seelam A.J., Ben Nas M., Fiorina P. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2020. № 3. P. 1744–1768.
2. Gvazava I.G., Rogovaya O.S., Borisov M.A., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 1. P. 24–33.
3. King A.J.F., Estiltes E., Montanya E. // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2128. P. 135–147.
4. Deeds M.C., Anderson J.M., Armstrong A.S., Gastineau D.A., Hiddinga H.J., Jahangir A., Eberhardt N.L., Kudva Y.C. // *Lab. Anim.* 2011. V. 45. № 3. P. 131–140.
5. Diabetic Complications Consortium. High-dose streptozotocin induction protocol (mice). 2015. <https://www.diacomp.org/shared/protocols.aspx>.
6. Chaudhry Z.Z., Morris D.L., Moss D.R., Sims E.K., Chiong Y., Kono T., Evans-Molina C. // *Lab. Anim.* 2015. V. 47. № 4. P. 257–265.
7. Estiltes E., Tellez N., Nacher M., Montanya E. // *Cell Transplant.* 2018. V. 27. № 11. P. 1684–1691.
8. Kintoko K., Xu X., Lin X., Jiao Y., Wen Q., Chen Z., Wei J., Liang T., Huang R. // *Arch. Med. Sci.* 2018. V. 14. № 5. P. 1163–1172.
9. Graham M.L., Janecek J.L., Kittredge J.A., Hering B.J., Schuurman H.J. // *Comp. Med.* 2011. V. 61. № 4. P. 356–360.
10. Cavelti-Weder C., Li W., Zumsteg A., Stemann-Andersen M., Zhang Y., Yamada T., Wang M., Lu J., Jermendy A., Bee Y.M., et al. // *Diabetologia.* 2016. V. 59. № 3. P. 522–532.
11. Ricordi C., Kneteman N.M., Scharp D.W., Lacy P.E. // *World J. Surg.* 1988. V. 12. № 6. P. 861–865.
12. Zhao T., Luo D., Sun Y., Niu X., Wang Y., Wang C., Jia W. // *J. Mol. Histol.* 2018. V. 49. № 4. P. 419–428.
13. Merckodia Technical Note No 334-0137 v4.0. Analysis of insulin, C-peptide or proinsulin from acid ethanol extractions from islets, cells or tissue. Merckodia AB, 2019.
14. Christoffersson G., Henriksnas J., Johansson L., Rolny C., Ahlstrom H., Caballero-Corbalan J., Segersvard R., Permert J., Korsgren O., Carlsson P.O., et al. // *Diabetes.* 2010. V. 59. № 10. P. 2569–2578.
15. Harper J.M., Durkee S.J., Smith-Wheelock M., Miller R.A. // *Exp. Gerontol.* 2005. V. 40. № 4. P. 303–314.
16. Miller R.G., Yu L., Becker D.J., Orchard T.J., Costacou T. // *Diabet. Med.* 2020. V. 37. № 8. P. 1386–1394.

УДК 612.816

# Закисление цитоплазмы угнетает мобилизацию синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях

А. Л. Зефирова<sup>1,2</sup>, Р. Д. Мухамедзянов<sup>1</sup>, А. В. Захаров<sup>1,3</sup>, К. А. Мухутдинова<sup>2</sup>,  
Ю. Г. Одношвикина<sup>1</sup>, А. М. Петров<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, кафедра нормальной физиологии, Казань, 420012 Россия

<sup>2</sup>Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

<sup>3</sup>Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

<sup>4</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, 420111 Россия

\*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020

Принята к печати 07.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11054

**РЕФЕРАТ** Внутриклеточные протоны играют особую роль в регуляции пресинаптических процессов, поскольку функционирование синаптических везикул и эндосомных структур зависит от закисления их содержимого  $H^+$ -помпой. Более того, при синаптической активности в нервных окончаниях происходит закисление цитоплазмы. С использованием микроэлектродной регистрации постсинаптических сигналов (показатель секреции нейромедиатора) и экзо-эндоцитозного маркера FM1-43 нами изучено влияние закисления цитоплазмы пропионатом на пресинаптические процессы, обеспечивающие освобождение нейромедиатора. Обнаружено, что в диафрагме мыши и кожно-грудинной мышце лягушки внутриклеточный ацидоз вызывает выраженное снижение секреции нейромедиатора в начальную минуту 20 Гц-стимуляции. Это сопровождается резким замедлением освобождения FM1-43 в ходе экзоцитоза синаптических везикул в ответ на стимуляцию. Эксперименты с оценкой захвата FM1-43 показали отсутствие нарушений эндоцитоза синаптических везикул. Закисление полностью предотвращало действие проникающего через мембраны агента (24-гидроксихолестерина), усиливающего мобилизацию синаптических везикул. Мы предполагаем, что повышение  $[H^+]_{in}$  угнетает нейротрансмиттерную передачу за счет замедления доставки синаптических везикул в сайты экзоцитоза при интенсивной активности. Этот механизм может регулировать секрецию нейромедиатора по принципу отрицательной обратной связи.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** экзоцитоз, транспорт синаптических везикул, нейротрансмиттерная передача, ацидификация, нервно-мышечный синапс.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АЗ – активная зона; НО – нервное окончание; СВ – синаптическая везикула; ПКП – потенциалы концевой пластинки.

## ВВЕДЕНИЕ

Синаптическая передача базируется на освобождении нейромедиатора из синаптических везикул (СВ) путем экзоцитоза в ответ на прибытие потенциала действия из аксона в нервное окончание (НО). Этот механизм носит универсальный характер и зависит от поступления СВ (мобилизации) в сайты экзоцитоза – активные зоны (АЗ), где сконцентрированы белки экзоцитоза и потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы [1]. В свою очередь, мобилизация определяется количеством доступных СВ, которые располагаются рядом с АЗ, и поступлением СВ, вновь сформирован-

ных посредством эндоцитоза сразу после экзоцитоза. В условиях постоянной ритмической или умеренно-частотной активности скорость мобилизации определяет уровень секреции нейромедиатора, а следовательно, надежность нейротрансмиттерной передачи [2, 3].

Фундаментальные механизмы, контролирующие мобилизацию СВ, до сих пор недостаточно изучены. Установлено важное значение цитоскелета, моторных белков и малых GTP-аз в контроле движения СВ [4]. Однако значимость такого важного фактора, как величина цитоплазматического рН, не выяснена. Хотя известно, что в процессе синаптической

активности внутри НО происходят изменения рН, связанные с работой протонной помпы и везикулярных транспортеров нейромедиатора, которые встраиваются в пресинаптическую мембрану после экзоцитоза СВ, сохраняя функциональную активность [5, 6]. Также обмен  $\text{Ca}^{2+}$  на протоны  $\text{Ca}^{2+}$ -АТР-азой пресинаптической мембраны может участвовать в закислении цитоплазмы в ответ на повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  при деполяризации, в то время как  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник участвует в восстановлении рН внутри НО [7]. Показано, что интенсивная стимуляция вызывает снижение рН цитозоля НО в нервно-мышечных синапсах плодовой мушки, а также мыши и крысы [5–7]. Однако значение внутриклеточного ацидоза, вызванного синаптической активностью, для пресинаптических процессов не выяснено.

В ранних работах показано, что клатринзависимый эндоцитоз может ингибироваться при сильном падении рН в клетках [8]. Это может определяться нарушением сборки клатринового покрытия, функционирования адаптерных белков, снижением синтеза фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатов [9, 10]. Однако транслировать это на синаптический аппарат нельзя, поскольку процессы эндоцитоза в синапсе высокоспециализированы и требуют участия специфического набора белков; также в синапсе сосуществуют несколько вариантов эндоцитоза, в том числе, не зависящие от клатрина [11]. Так, ингибитор карбоангидразы, снижая рН в цитозоле, переключает тип эндоцитоза в нервно-мышечном синапсе мыши на клатриннезависимый [12].

В целом, пока нет понимания того, как снижение цитоплазматического рН может влиять на секрецию нейромедиатора и мобилизацию СВ при продолжительной активности. В представленной работе, используя электрофизиологическую детекцию освобождения нейромедиатора и флуоресцентный метод для слежения за процессами экзо-эндоцитоза, впервые показано, что закисление цитоплазмы способно выразенно ингибировать мобилизацию СВ в нервно-мышечных синапсах холоднокровных и теплокровных животных. Мы предполагаем, что этот феномен может быть новым физиологическим механизмом регуляции транспорта СВ при синаптической активности.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы белых мышей и кожно-грудинной мышцы озерных лягушек (*Rana ridibunda*) в осенне-зимний период в соответствии со стандартами по использованию лабораторных животных. Экспериментальный протокол, соответствующий Директиве 2010/63/EU

по проведению экспериментов на животных, получил одобрение этического комитета Казанского медицинского университета.

### Растворы и реактивы

Мышцу растягивали и фиксировали в ванночке объемом 5 мл при непрерывной перфузии. В экспериментах на мышце мыши использовали насыщенный кислородом раствор Кребса следующего состава (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 144.0,  $\text{KCl}$  – 5.0,  $\text{MgCl}_2$  – 0.1,  $\text{CaCl}_2$  – 2.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 1.0,  $\text{NaHCO}_3$  – 2.4, глюкоза – 11.0. В экспериментах на мышце лягушки использовали раствор Рингера (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 115.0,  $\text{KCl}$  – 2.5,  $\text{CaCl}_2$  – 1.8,  $\text{NaHCO}_3$  – 2.4. рН растворов поддерживали на уровне 7.3–7.4 при температуре 20°C. Для блокирования сокращений мышечных волокон использовали *d*-тубокурарин (2–5 мкМ). Для индукции закисления цитоплазмы использовали модифицированные растворы Кребса и Рингера, в которых часть хлорида натрия (именно 72 ммоль/л) была замещена на пропионат натрия. В итоге концентрация пропионата натрия в модифицированных растворах составила 72 ммоль/л; рН и осмотичность при этом поддерживались на том же уровне, что и в нормальных физиологических растворах. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Эксперименты начинали после перфузии препаратов растворами с пропионатом в течение 45–50 мин. 24-Гидроксихолестерин (0.4 мкМ) апплицировали на 15 мин.

### Электрофизиология

Потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали внутриклеточно стеклянными микроэлектродами (диаметр кончика менее 1 мкм, сопротивление 5–20 МОм), заполненными 3 М  $\text{KCl}$ . Для усиления и регистрации ПКП использовали автоматизированную систему, созданную на базе усилителя (модель 1600 А-M System) и АЦП (JLA-2USB), под контролем оригинального программного обеспечения Elph [13]. Двигательный нерв раздражали прямоугольными импульсами длительностью 0.1–0.2 мс с частотой 20 Гц в течение 3 мин (стимулятор модель 2100 А-M). Затем частоту стимуляции снижали до 0.3 Гц и регистрировали восстановление амплитуды ПКП [14, 15].

Квантовый состав ПКП рассчитывали с использованием модифицированного метода вариаций, детально описанного нами ранее [3]. С этой целью определяли площадь каждого ПКП в серии. Далее на графике динамики снижения площади ПКП при высокочастотном раздражении находили участок, в котором средняя площадь ПКП практически не менялась (фаза «плато», обычно первые 10–30 с). По колебаниям площади ПКП в этом участке можно рассчитать квантовую величину, т.е. среднюю вели-

чину площади ПКП, производимую одним квантом медиатора ( $q$ ):  $q = \sigma^2 / \langle V \rangle$ , где  $\sigma$  – стандартное отклонение площади ПКП,  $\langle V \rangle$  – средняя площадь ПКП на данном участке. Далее можно определить квантовый состав каждого ПКП в серии:  $m_i = V_i / q$ , где  $m_i$  – квантовый состав  $i$ -го ПКП,  $V_i$  – площадь  $i$ -го ПКП.

### Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа Olympus BX-51WI. Использовали объективы Olympus UPLANSapo с увеличением 60 и LumPlanPF с увеличением 100. Изображения регистрировали видеокамерой DP71 (Olympus) под контролем программы CellSens (Olympus). Программа ImagePro (Media Cybernetics) была использована для анализа свечения.

Краситель FM1-43 (5 мкМ) использовали для оценки эндо-экзоцитоза СВ. FM1-43 обратимо связывается с пресинаптической мембраной и в ходе эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся СВ («загружается»). При загрузке красителя в НО появляются светящиеся пятна, отражающие скопления СВ в области АЗ [16, 17]. Для оценки эндоцитоза СВ FM1-43 присутствовал в течение стимуляции и 10 мин после ее завершения, чтобы процессы эндоцитоза, вызванные стимуляцией экзоцитоза, полностью завершились. После этого препарат отмывали в течение 40 мин в физиологическом растворе, содержащем реагент ADVASEP-7 (5 мкМ), способствующий диссоциации FM1-43 с поверхностных мембран [18]. Образованные в результате эндоцитоза СВ, захватившие FM1-43, начинают терять его при новом раунде экзоцитоза. Чтобы оценить динамику экзоцитоза, предварительно загруженные (с помощью стимуляции – 3 мин, 20 Гц) FM1-43-препараты повторно стимулировали (10–20 мин, частота 20 Гц), анализировали снижение интенсивности флуоресценции вследствие экзоцитоза красителя (выгрузка) [19]. Свойства маркера FM1-43 не зависят от pH в диапазоне 5–9 [20], 0,4 мкМ 24-ГХ также не влияет на флуоресценцию FM1-43 [21, 22].

Флуоресценцию FM1-43 детектировали с использованием возбуждающего светофильтра 480/10 нм, дихроического зеркала 505 нм и эмиссионного фильтра 535/40 нм. Свечение оценивали как среднюю яркость пикселей в регионе интереса после вычитания фонового свечения. При определении скорости потери красителя в ходе выгрузки начальное свечение НО до начала стимуляции принимали равным 1.0.

Радиометрический флуоресцентный индикатор BCECF AM (Molecular Probes) был использован как сенсор цитоплазматического pH. Мышцы инкубировали в течение 15 мин с 5 мкМ красителя, после чего перфузировали в течение 30 мин для сниже-

ния фоновой флуоресценции. Загруженные красителем синаптические контакты освещали попеременно вспышками света (1 с, 505/10 и 450/10 нм), флуоресценцию детектировали в синаптическом регионе, используя широкополосный эмиссионный фильтр 530 нм. Отношение флуоресценции  $I^{505}/I^{450}$  при возбуждении на двух длинах волн использовали для оценки величины внутриклеточного pH. Снижение отношения  $I^{505}/I^{450}$  указывает на уменьшение значений pH в цитоплазме. В конце каждого эксперимента мышцы перфузировали фосфатным буфером (ммоль/л: NaCl – 138, KCl – 2,7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,8) с 10 мкМ нигерицина для выравнивания вне- и внутриклеточного pH, затем отношение  $I^{505}/I^{450}$  оценивали при экспозиции препарата буфером с различными значениями pH (7,4–7,1) для калибровки [5].

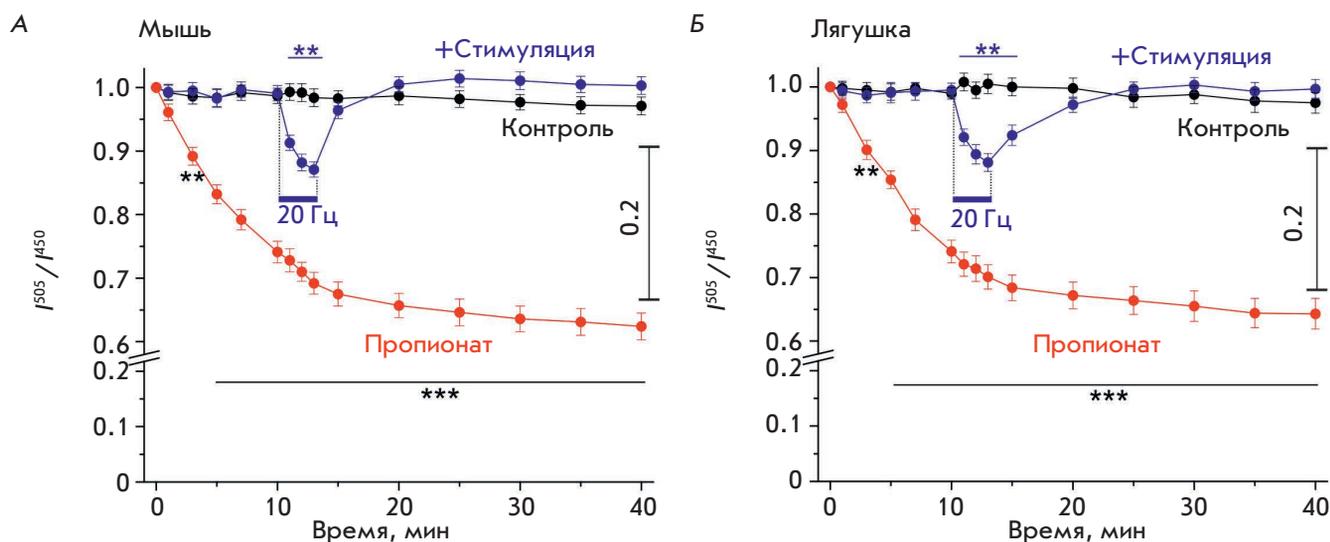
### Статистика

Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка,  $n$  – количество независимых экспериментов на отдельных животных (указано в подписях к рисункам). Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни; статистически значимыми считали отличия на уровне  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Мониторинг закисления внутриклеточной среды

Известно, что анионы слабых кислот закисляют внутреннюю среду клеток. При этом для моделирования внутриклеточного ацидоза широко используется пропионат [23]. Пропионовая кислота в недиссоциированной форме проникает в цитоплазму, где она диссоциирует, уменьшая pH. Действительно, слежение за цитоплазматическим pH с помощью BCECF показало, что аппликация пропионата вела к снижению отношения  $I^{505}/I^{450}$ , указывая на снижение pH в препаратах мышцы и лягушки (рис. 1А,Б). К 40 мин аппликации пропионата отношение  $I^{505}/I^{450}$  уменьшалось до стационарного уровня, ~60–65% по сравнению с исходным (на ~0,25 единицы pH). Это соизмеримо с ранее оцененным изменением pH под влиянием пропионата в синапсах крысы [5]. В контроле отношение  $I^{505}/I^{450}$  оставалось на одинаковом уровне в течение 40 мин (рис. 1А,Б), что указывает на стабильность  $\text{pH}_{\text{in}}$  в покое. Стимуляция (20 Гц) вела к временному снижению  $I^{505}/I^{450}$  в синаптическом регионе (рис. 1А,Б). Это согласуется с представлениями, что при синаптической активности происходит закисление внутриклеточной среды НО, а после завершения активности pH восстанавливается с медленной кинетикой [5–7].



**Рис. 1.** Мониторинг цитоплазматического pH в синаптическом регионе. Отношение интенсивностей флуоресценции ВСЕСФ при возбуждении светом с длиной волны 505 и 450 нм ( $I^{505}/I^{450}$ ) служит индикатором pH и снижается при его уменьшении. А, Б – измерения  $I^{505}/I^{450}$  в синаптических регионах мыши (А) и лягушки (Б) в покое (контроль), при стимуляции (3 мин, 20 Гц, показано синим сегментом) в присутствии пропионата (72 ммоль/л). Ось ординат: отношение  $I^{505}/I^{450}$  в начальный момент принято за 1.0.  $n = 7$  для каждой кривой. Шкала справа иллюстрирует снижение соотношения  $I^{505}/I^{450}$  при уменьшении внутриклеточного pH на 0.2 единицы. Планки погрешностей – стандартные ошибки.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  – статистическая значимость различий между кривыми

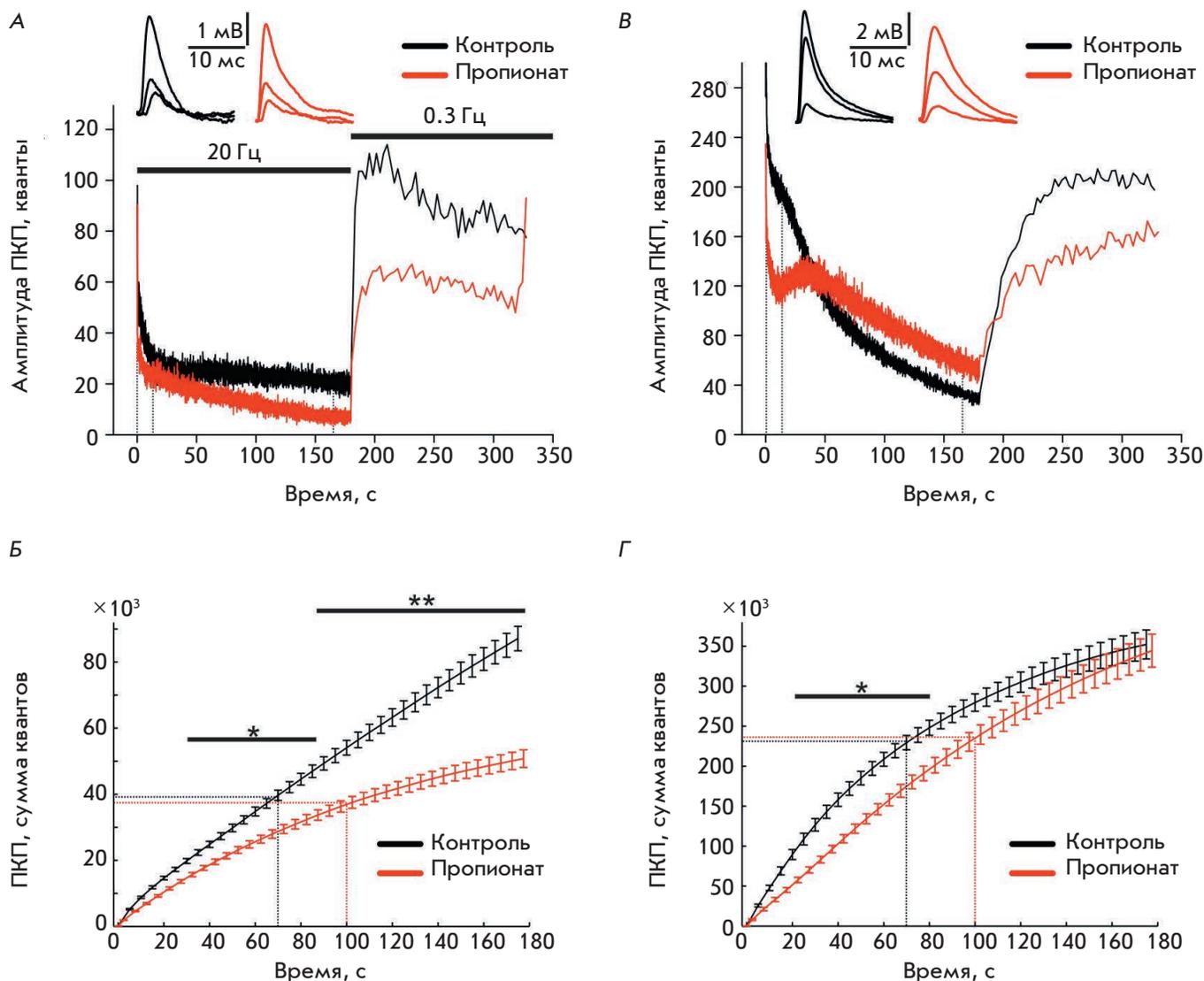
**Динамика секреции нейромедиатора. Влияние закисления внутриклеточной среды**

Продолжительная синаптическая активность поддерживается за счет доставки СВ (мобилизации) из рециклирующего и резервного пулов в АЗ с последующим освобождением нейромедиатора [1, 3]. В контроле при раздражении диафрагмального нерва мыши электрическими импульсами (при частоте 20 Гц) квантовый состав ПКП быстро падал за первые 5–10 импульсов до 20–25% от исходного значения ( $155 \pm 20$  квантов). Затем квантовый состав стабилизировался и медленно снижался к 3 мин раздражения, составляя 10–15% от первоначального. После окончания раздражения быстро происходило восстановление квантового состава ПКП до 50% от исходного уровня ( $6 \pm 2$  с, рис. 2А). Подобная динамика ПКП в ответ на 20 Гц-стимуляцию и быстрое восстановление секреции согласуется с представлениями, согласно которым в двигательных НО мыши секреция нейромедиатора при 20 Гц-стимуляции обеспечивается вначале везикулами готового к освобождению пула и затем рециклирующего пула [2, 3]. СВ рециклирующего пула быстро восстанавливаются посредством эндоцитоза, повторно участвуя в освобождении нейромедиатора.

Аппликация пропионата не вызывала статистически значимого изменения квантового состава первого ПКП ( $128 \pm 17$  квантов,  $P < 0.05$ ), однако заметно ускоряла депрессию ПКП в нервно-мышеч-

ных синапсах мыши (рис. 2А). В итоге к 3 мин 20 Гц-стимуляции квантовый состав снижался до 3–5% от исходного. Восстановление квантового состава после прекращения раздражения происходило медленнее, чем в контроле (до 50% от исходного значения за  $13 \pm 3$  с). Для количественной оценки секреции медиатора строили кумулятивные кривые, суммируя квантовые составы каждого ПКП за 3 мин 20 Гц-раздражения, и определяли общее количество квантов, освободившихся из НО. Оказалось, что за 3 мин раздражения в контроле освобождалось  $(90 \pm 3.9) \times 10^3$  квантов, эта величина была существенно меньше при действии пропионата ( $P < 0.01$ ) –  $(51 \pm 2.8) \times 10^3$  квантов (рис. 2Б). Следовательно, закисление цитоплазмы НО мыши заметно угнетает нейротрансдукцию при интенсивной синаптической активности за счет ослабления освобождения нейромедиатора СВ рециклирующего пула.

В кожно-грудинной мышце лягушки 20 Гц-стимуляция сопровождалась первоначальным (в течение 30–40 раздражений) падением квантового состава ПКП до примерно 80% от исходного уровня ( $272 \pm 30$  квантов). Затем квантовый состав стабилизировался на 3–5 с (плато) и далее постепенно уменьшался к 3 мин раздражения до 10–15% от исходного значения (рис. 2В). Восстановление квантового состава после прекращения 20 Гц-раздражения происходило за  $18 \pm 3$  с до 50% от исходной величины. Подобная динамика указывает на то, что в секреции участвует



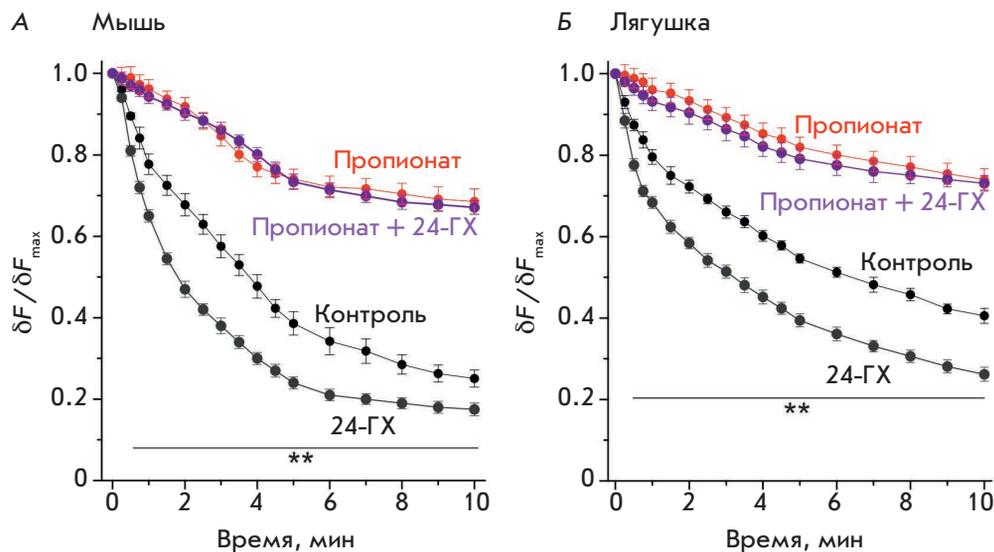
**Рис. 2.** Динамика секреции медиатора при раздражении с частотой 20 Гц. А, В – изменение квантового состава ПКП в двигательном НО мыши (А) и лягушки (В) при стимуляции в контроле и при закислении внутриклеточной среды пропионатом. Также показано восстановление квантового состава после 20 Гц-стимуляции. Сверху нативные ПКП в моменты стимуляции, отмеченные на графиках пунктирными линиями. Приведены усредненные кривые,  $n = 5$ . Б, Г – кумулятивные кривые квантовых составов ПКП при 20 Гц-раздражении в двигательном НО мыши (Б) и лягушки (Г). Планки погрешностей – стандартные ошибки. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  – статистическая значимость различий между кривыми;  $n = 5$ . Пунктирные линии указывают на времена (70 и 100 с), при которых в контроле и на фоне действия пропионата освобождается примерно одинаковое количество квантов

не только немедленно готовый к освобождению и рециклирующий пул, но и резервный пул [2, 3, 24].

В кожно-грудинной мышце лягушки на фоне действия пропионата квантовый состав первого ПКП не отличался значимо от контроля, составляя  $227 \pm 35$  квантов, первоначальная депрессия ПКП была более выраженной, а фаза плато характеризовалась большей длительностью. Восстановление квантового состава после 20 Гц-стимуляции происходило медленнее по сравнению с контролем (до 50% за  $21 \pm 3$  с)

(рис. 2В). Сравнение кумулятивных кривых квантовых составов ПКП указывает на снижение секреции под действием пропионата, выраженное в 1-ю минуту 20 Гц-стимуляции (рис. 2Г), затем к 3 мин стимуляции секреция достигала контрольных значений, составляя  $(347 \pm 13) \times 10^3$  квантов (в контроле  $(355 \pm 17) \times 10^3$  квантов). Таким образом, в НО лягушки закисление цитоплазмы угнетает освобождение нейромедиатора в период, когда секреция происходит за счет СВ рециклирующего пула.





**Рис 4.** Влияние закисления цитоплазмы на эффект 24-гидроксихолестерина (24-ГХ) на экзоцитоз при 20 Гц-стимуляции. А, Б – динамика выгрузки красителя FM1-43 из двигательных НО мыши (А) и лягушки (Б) при аппликации 24-ГХ в контроле и на фоне действия пропионата.  $n = 8$  для каждой кривой. Показаны также кривые в контроле и в присутствии пропионата (из рис. 3Б,В). Плankи погрешностей – стандартные ошибки.  $**P < 0.01$  – статистическая значимость различий между контролем и действием 24-ГХ. Ось ординат: нормированная флуоресценция, где 1.0 – значение непосредственно перед началом стимуляции

стимуляции в нервно-мышечных синапсах [21]. Обработка 24-гидроксихолестерином (0.4 мкМ) ускоряла выгрузку FM1-43 при 20 Гц-стимуляции (рис. 4А,Б). Эффект выражен в схожей степени в НО мыши и лягушки. На фоне действия пропионата 24-гидроксихолестерин полностью утрачивал способность ускорять темп выброса FM1-43 в ходе экзоцитоза (рис. 4А,Б). Следовательно, внутриклеточное закисление блокировало возможность ускорения мобилизации СВ при 20 Гц-активности.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные регуляторные контуры, действующие на экзоцитоз, мобилизацию и эндоцитоз СВ, обеспечивают должный уровень освобождения нейромедиатора в ходе синаптической активности. В представленном исследовании впервые получены данные, указывающие на угнетение мобилизации СВ при закислении внутриклеточной среды. Причем этот феномен наблюдали в НО как мыши, так и лягушки, что указывает на общие механизмы действия внутриклеточного ацидоза.

Пропионат эффективно снижал внутриклеточный рН на ~0.25, что в 2 раза превосходит степень закисления, вызванного стимуляцией двигательного нерва импульсами при частоте 20 Гц. Анализ постсинаптических ответов показал, что пропионат не менял значимо квантовый состав в ответ на пер-

вый стимул, тогда как ускорял депрессию секреции нейромедиатора в ответ на 20 Гц-стимуляцию. В подобных условиях секреция зависит от доставки СВ в АЗ. В синапсах мыши эффект пропионата ярко проявлялся на всем протяжении стимуляции, а в синапсах лягушки – только в первую минуту стимуляции. Подобная специфика действия пропионата связана, вероятно, с особенностями вовлечения пулов СВ в нейротрансдукцию при 20 Гц-стимуляции. В частности, в двигательных НО мыши при 20 Гц-активности рециклирующий пул обеспечивает длительное освобождение нейромедиатора, тогда как в двигательном НО лягушки этот пул поддерживает секрецию главным образом в течение первой минуты стимуляции, после чего СВ резервного пула используются для нейротрансдукции. Таким образом, пропионат, по-видимому, угнетает вовлечение СВ рециклирующего пула в секрецию. Такая избирательность внутриклеточного ацидоза согласуется с представлениями о существовании независимых путей регуляции рециклирующего и резервного пулов [15, 19, 25–27]. Более того, темп депрессии секреции нейромедиатора в нервных окончаниях лягушки при воздействии пропионата замедлялся после 60 с, в итоге за 3 мин стимуляции количество освобожденных квантов медиатора не отличалось от количества в контроле. Подавление рекрутирования СВ рециклирующего пула способствует, воз-

можно, освобождению нейромедиатора СВ резервного пула.

Участие СВ рециклирующего пула определяется как их мобилизацией в сайты экзоцитоза, так и их образованием путем эндоцитоза. Оценка захвата FM1-43 показала, что пропионат не нарушает эндоцитоз, реформирующий СВ, после их экзоцитоза. Однако пропионат заметно снижает скорость выброса красителя FM1-43 из СВ в течение 20 Гц-стимуляции. Это непосредственно указывает на ослабление доставки СВ в АЗ. Примечательно, что особенно сильное замедление освобождения FM1-43 в НО лягушки наблюдалось в первую минуту 20 Гц-раздражения. Это согласуется с предположением о нарушении мобилизации СВ рециклирующего пула под влиянием внутриклеточного ацидоза.

Механизмы, регулирующие мобилизацию СВ, организованы иерархично и координированно. Холестерин, его содержание в мембранах и метаболиты действуют как мощные регуляторы транспорта СВ и в ЦНС, и в нервно-мышечных синапсах [22, 28–31]. Ранее мы обнаружили, что главный метаболит холестерина в мозге – 24-гидроксихолестерин, который производится преимущественно нейронами, в том числе в синаптических регионах, способен усиливать участие СВ рециклирующего пула в освобождении нейромедиатора в нервно-мышечных синапсах мышцы [21]. При этом эффект гидроксихолестерина зависит от протеинкиназы G, которая контролирует функционирование рециклирующего пула СВ в НО лягушки [19]. Оказалось, что 24-гидроксихолестерин ускоряет освобождение FM1-43 в ходе экзоцитоза в НО мышцы и лягушки, тогда как пропионат полностью предотвращает его действие. Следовательно, закисление цитоплазмы может быть доминирующим фактором, препятствующим усилению освобождения нейромедиатора в ответ на гуморальные влияния.

Связь внутриклеточного ацидоза с мобилизацией СВ имеет, возможно, физиологическое и (или) патологическое значение. Временное снижение рН в НО [5–7] может подавлять мобилизацию СВ для ограничения освобождения нейромедиатора при интенсивной активности. Таким образом может формироваться механизм отрицательной обратной связи, лимитирующий секрецию при интенсивной активности. Замедление доставки СВ в АЗ также способно предоставлять время для полного протекания эндоцитоза СВ и, следовательно, пополнения рециклирующего пула. Снижение внутриклеточного рН в нейронах происходит при широком спектре пато-

логических состояний (метаболические нарушения, ишемия, эпилептическая активность, нейродегенеративные заболевания) и старении [32–34]. В подобных условиях повышенное освобождение глутамата и ацетилхолина вызывает повреждение центральных и нервно-мышечных синапсов [35, 36], а олесоксим, способный увеличивать приток анионов хлора (следовательно, протонов) в НО и ограничивать освобождение нейромедиатора, обладает выраженными нейрорепрессивными свойствами [31]. Схожим образом антиэпилептический препарат леветирацетам снижает рН в неокортикальных нейронах, что, вероятно, вносит вклад в антиконвульсантные свойства препарата [37]. Небольшая ацидификация цитоплазмы также может лежать в основе антиконвульсантного действия короткоцепочечных монокарбоксилатов и кетоновых тел [23]. Потенциально системный кетоацидоз может ограничивать двигательную производительность, угнетая нервно-мышечную передачу на уровне мобилизации СВ.

Молекулярный механизм действия внутриклеточного рН на транслокацию СВ в АЗ неизвестен. Он может быть связан с изменениями в работе митохондрий [38], Ca<sup>2+</sup>-сигнализации [39] и белок-белковых взаимодействий [40]. Высокая чувствительность этапа мобилизации СВ рециклирующего пула к изменению рН предполагает наличие рН-сенсора. Возможно, перемещение СВ с помощью моторных белков по актиновым филаментам в рециклирующий пул угнетается при снижении рН в НО. Так, локальные взаимодействия F-актина с миозином сильно зависят от величины рН [41].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значение рН в цитоплазме пресинаптических НО снижается в ответ на увеличение синаптической активности в физиологических условиях; более выраженное падение рН может происходить при патологиях. В представленной работе впервые получены данные, указывающие на способность закисления цитоплазмы ограничивать нейротрансдукцию посредством угнетения мобилизации СВ в АЗ при интенсивной активности. Этот феномен может быть частью сложного механизма, регулирующего нейротрансдукцию на основе кислотно-основных процессов в нейроне. ●

*Работа поддержана частично грантами РФФИ № 20-015-00507 и 20-04-00077, а также государственным заданием ФИЦ КазНЦ РАН.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dittman J.S., Ryan T.A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. № 3. P. 177–186.
2. Зефи́ров А.Л., Захаров А.В., Мухамедзянов Р.Д., Петров А.М. // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2008. Т. 44. № 6. С. 603–612.
3. Zakharov A.V., Petrov A.M., Kotov N.V., Zefirov A.L. // *Biophysics.* 2012. V. 57. № 4. P. 508–518.
4. Rizzoli S.O. // *EMBO J.* 2014. V. 33. № 8. P. 788–822.
5. Petrov A.M., Naumenko N.V., Uzinskaya K.V., Giniatullin A.R., Urazaev A.K., Zefirov A.L. // *Neuroscience.* 2011. V. 186. P. 1–12.
6. Zhang Z., Nguyen K.T., Barrett E.F., David G. // *Neuron.* 2010. V. 68. № 6. P. 1097–1108.
7. Rossano A.J., Kato A., Minard K.I., Romero M.F., Macleod G.T. // *J. Physiol.* 2017. V. 595. № 3. P. 805–824.
8. Sandvig K., Olsnes S., Petersen O.W., van Deurs B. // *J. Cell Biochem.* 1988. V. 36. № 1. P. 73–81.
9. Brown C.M., Petersen N.O. // *Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 77. № 5. P. 439–448.
10. Dejonghe W., Kuenen S., Mylle E., Vasileva M., Keech O., Viotti C., Swerts J., Fendrych M., Ortiz-Morea F.A., Mishev K., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11710.
11. Watanabe S., Boucrot E. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017. V. 47. P. 64–71.
12. Bertone N.I., Groisman A.I., Mazzone G.L., Cano R., Tabares L., Uchitel O.D. // *Synapse.* 2017. V. 71. № 12. P. e22009.
13. Захаров А.В. // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* 2019. Т. 161. № 2. С. 245–254.
14. Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1851. № 5. P. 674–685.
15. Kasimov M.R., Zakyrganova G.F., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1861. № 7. P. 606–616.
16. Зефи́ров А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология.* 2003. Т. 45. № 12. С. 1163–1171.
17. Betz W.J., Bewick G.S. // *J. Physiol.* 1993. V. 460. № 1. P. 287–309.
18. Kay A.R., Alfonso A., Alford S., Cline H.T., Holgado A.M., Sakmann B., Snitsarev V.A., Stricker T.P., Takahashi M., Wu L.G. // *Neuron.* 1999. V. 24. № 4. P. 809–817.
19. Petrov A.M., Giniatullin A.R., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 49. P. 13216–13222.
20. Betz W.J., Mao F., Smith C.B. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. V. 6. № 3. P. 365–371.
21. Kasimov M.R., Fatkhrahmanova M.R., Mukhutdinova K.A., Petrov A.M. // *Neuropharmacology.* 2017. V. 117. P. 61–73.
22. Mukhutdinova K.A., Kasimov M.R., Zakyrganova G.F., Gumerova M.R., Petrov A.M. // *Neuropharmacology.* 2019. V. 150. P. 70–79.
23. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *Life Sci.* 2018. V. 204. P. 65–70.
24. Mukhametshina A.R., Fedorenko S.V., Petrov A.M., Zakyrganova G.F., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nizameev I.R., Mustafina A.R., Sinyashin O.G. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 17. P. 14948–14955.
25. Petrov A.M., Giniatullin A.R., Zefirov A.L. // *Neurochem. J.* 2008. V. 2. № 3. P. 175–182.
26. Petrov A.M., Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L. // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2014. V. 44. № 9. P. 1020–1030.
27. Marra V., Burden J.J., Thorpe J.R., Smith I.T., Smith S.L., Hausser M., Branco T., Staras K. // *Neuron.* 2012. V. 76. № 3. P. 579–589.
28. Teixeira G., Vieira L.B., Gomez M.V., Guatimosim C. // *Neurochem. Int.* 2012. V. 61. № 7. P. 1151–1159.
29. Wasser C.R., Ertunc M., Liu X., Kavalali E.T. // *J. Physiol.* 2007. V. 579. Pt 2. P. 413–429.
30. Krivoi I.I., Petrov A.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 5. P. 1046.
31. Zakyrganova G.F., Gilmutdinov A.I., Tsentsevitsky A.N., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids.* 2020. V. 1865. № 9. P. 158739.
32. Xiong Z.Q., Saggau P., Stringer J.L. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 4. P. 1290–1296.
33. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2018. V. 125. № 10. P. 1495–1501.
34. Majdi A., Mahmoudi J., Sadigh-Eteghad S., Golzari S.E., Sabermarouf B., Reyhani-Rad S. // *J. Neurosci. Res.* 2016. V. 94. № 10. P. 879–887.
35. Meldrum B.S. // *Neurology.* 1994. V. 44. № 11 Suppl 8. P. S14–23.
36. Sugita S., Fleming L.L., Wood C., Vaughan S.K., Gomes M.P., Camargo W., Naves L.A., Prado V.F., Prado M.A., Guatimosim C., Valdez G. // *Skelet. Muscle.* 2016. V. 6. P. 31.
37. Bonnet U., Bingmann D., Speckmann E.J., Wiemann M. // *Brain Res.* 2019. V. 1710. P. 146–156.
38. Pekun T.G., Lemeshchenko V.V., Lyskova T.I., Waseem T.V., Fedorovich S.V. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. № 1. P. 211–222.
39. Trudeau L.E., Parpura V., Haydon P.G. // *J. Neurophysiol.* 1999. V. 81. № 6. P. 2627–2635.
40. Sinning A., Hubner C.A. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. № 13. P. 1923–1928.
41. Kohler S., Schmoller K.M., Crevenna A.H., Bausch A.R. // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 3. P. 433–439.

УДК 577.21

# Белок CG9890 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с комплексами модификации и ремоделирования хроматина на промоторах генов и участвует в регуляции транскрипции

Н. А. Фурсова, М. Ю. Мазина, Ю. В. Николенко, Н. Е. Воробьева, А. Н. Краснов\*

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

\*E-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 22.05.2020

Принята к печати 19.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11056

**РЕФЕРАТ** Проведено полногеномное исследование белка CG9890, содержащего домены цинковых пальцев. Показано, что белок CG9890 локализован преимущественно на промоторах активных генов. Сайты связывания CG9890 характеризуются низкой плотностью нуклеосом и колокализируются с комплексами модификации и ремоделирования хроматина SAGA и dSWI/SNF, а также с репликационным комплексом ORC. Показано, что белок CG9890 участвует в регуляции экспрессии части генов, на промоторах которых он находится, причем заметную долю этих генов составляют гены экдизонового каскада. Таким образом, белок CG9890 является новым участником транскрипционной сети клетки, локализуется на активных промоторах, взаимодействует с основными транскрипционными и репликационными комплексами и участвует в регуляции как базальной, так и индуцибельной транскрипции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ENY2, CG9890, дрозофила, цинковые пальцы, ChIP-Seq.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ENY2 – мультифункциональный транскрипционный фактор; C2H2 – цинковые пальцы типа C2H2; SAGA – гистон-ацетилтрансферазный комплекс; SWI/SNF – комплекс ремоделирования хроматина; AMEX – комплекс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму; TNO – комплекс элонгации транскрипции; ORC – комплекс позиционирования точек начала репликации в геноме.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранее в нашей лаборатории был выделен и охарактеризован белок ENY2, который впоследствии оказался компонентом множества белковых комплексов, вовлеченных в регуляцию транскрипции и репликации. ENY2 входит в состав транскрипционных комплексов SAGA, AMEX, TNO и связывает различные этапы экспрессии генов – организацию транскрипционных доменов и модификацию хроматина, активацию и элонгацию транскрипции, экспорт мРНК и регуляцию пространственного расположения генов в ядре [1–7]. Кроме того, обнаружено, что ENY2 также входит в состав репликационного комплекса ORC, ответственного за позиционирование точек начала репликации [8–11].

Анализ двухгибридного взаимодействия ENY2-Su(Hw) привел к пониманию того, что Su(Hw) привлекает белок ENY2 на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, что необходимо для осуществления барьерной функции [5]. Далее показали, что Su(Hw) рекрутирует гистон-ацетилтрансферазный комплекс SAGA [12] (содержащий ENY2) и комплекс ремоделирования хроматина dSWI/SNF [13–15] на Su(Hw)-зависимые инсуляторы, вызывая формирование области с низкой плотностью нуклеосом и условий для посадки репликационного комплекса ORC. Нокдаун Su(Hw) практически полностью нарушает привлечение комплексов SAGA, dSWI/SNF и ORC на Su(Hw)-зависимые инсуляторы и приводит к значительному увеличению плотности нуклео-

сом на этих регуляторных элементах [1, 2]. Показано, что Su(Hw) – это первый пример белка, ответственного за позиционирование точек начала репликации. Su(Hw) необходим для формирования 6% точек начала репликации в геноме дрозофилы, т.е. за формирование остальных 94% отвечают какие-то другие, еще не идентифицированные белки.

Ранее мы обнаружили взаимодействие ENY2 с еще одним белком, CG9890, который содержит домен цинковых пальцев C2H2-типа, как и Su(Hw) [16]. Мы предполагаем, что, как и Su(Hw), CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя, таким образом, регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. Показано, что белок CG9890 локализован в ядре клетки. Биохимическими методами выявлено взаимодействие белка CG9890 с ENY2-содержащими комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и THOC [16]. CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не взаимодействует с комплексом AMEX, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на работу CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла.

В данной работе проведен полногеномный анализ белка CG9890 с целью идентификации и характеристики регуляторных элементов, за которые он может быть ответствен.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Антитела и клеточные линии

В работе использовали линию клеток S2 *Drosophila melanogaster*. Поликлональные антитела  $\alpha$ -CG9890 получены из сыворотки крови кролика, иммунизированного полноразмерным белком CG9890, экспрессированным в клетках *Escherichia coli* [16].

### Иммунопреципитация хроматина и полногеномное секвенирование

Иммунопреципитацию хроматина проводили согласно [1]. Для этого использовали поликлональные антитела к CG9890, полученные нами ранее [16]. ChIP-Seq-библиотеки получали с использованием набора NEBNext DNA library preparation kit (New England Biolabs). Качество библиотек проверяли с помощью Bioanalyzer. Для высокопроизводительного секвенирования брали фрагменты размером 200–500 п.н. Библиотеки были отсеквенированы на геномном секвенаторе Illumina HiSeq 2000. Полученные последовательности картировали на референсный геном дрозофилы с использованием программы Bowtie2. Для последующего анали-

за использовали только уникально картированные риды. Идентификацию координат пиков и построение полногеномного профиля (WIG-файл) для белка CG9890 проводили с использованием программы SPP (FDR < 5%) [17]. Областью пика считали геномный интервал +/- 100 п.н. от позиции вершины пика.

### Биоинформатический анализ

Аннотации генов *D. melanogaster* были взяты с официального сайта FlyBase. Геном разбивали на следующие области: точки начала транскрипции (TSS), точки терминации транскрипции (TES), транскрибируемые области (участки генов за исключением TSS и TES) и межгенные области (все остальное). ChIP-Seq-пик идентифицировали как принадлежащий к одной из этих категорий при условии пересечения геномных интервалов как минимум в 10 п.н. При аннотации пиков использовали следующий приоритет геномных категорий – TSS, TES, транскрибируемые и межгенные области.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Белок CG9890 локализован преимущественно на промоторах генов

С целью определения локализации изучаемого белка в геноме мы провели иммунопреципитацию хроматина из клеток S2 с помощью поликлональных антител к белку CG9890 с последующим высокопроизводительным секвенированием (ChIP-Seq). Характерный ChIP-Seq-профиль белка CG9890 на одном из сайтов его связывания представлен на рис. 1. Идентифицировано 4709 сайтов посадки белка CG9890 в геноме дрозофилы (FDR < 5%).

Мы аннотировали полученные сайты по признаку их локализации в одном из следующих элементов генома дрозофилы: промоторы, концы генов, тела генов и межгенные области. Согласно полученным данным (рис. 2), наибольшее количество ChIP-Seq-пиков белка CG9890 (73.2%) локализуется в промоторных областях генов дрозофилы. Мы предполагаем, что, локализуясь преимущественно на промоторах генов, белок CG9890 может участвовать в функционировании регуляторных генетических элементов этого типа.

### Белок CG9890 колокализуется с комплексами модификации и ремоделирования хроматина в областях с низкой плотностью нуклеосом

Ранее мы подтвердили взаимодействие CG9890 с белком ENY2 и выявили взаимодействие CG9890 с ENY2-содержащими белковыми комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID, THO. Поэтому мы изучили геномную колокализацию белка CG9890

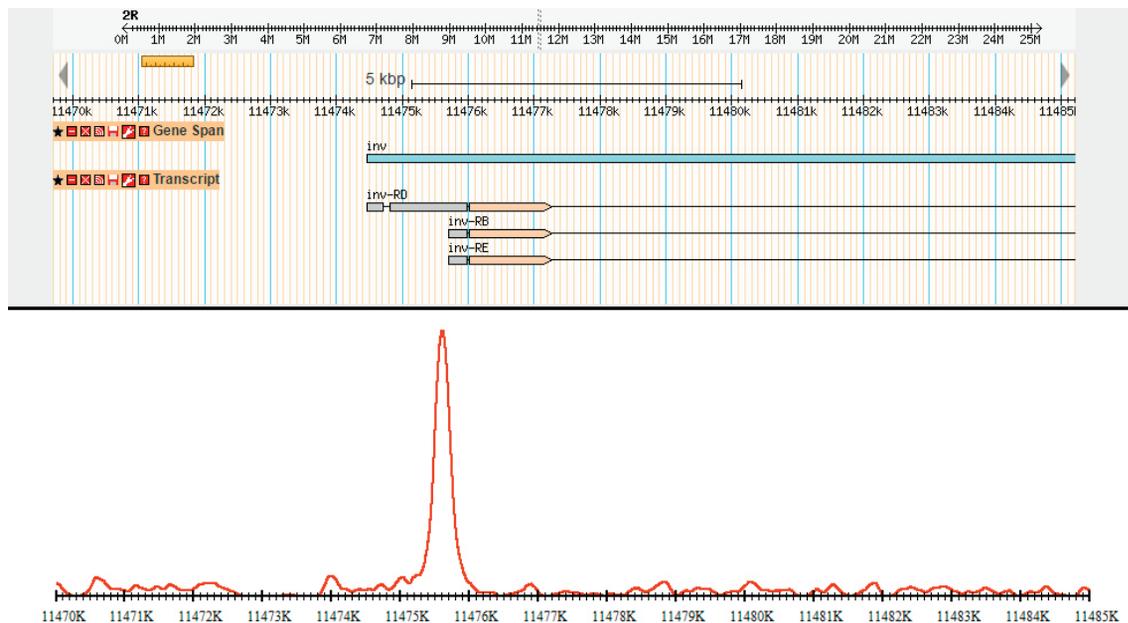


Рис. 1. Характерный ChIP-Seq-профиль белка CG9890. Представлен геномный регион, соответствующий промоторной области гена *Inv*. Верхняя часть рисунка содержит информацию об этом регионе из геномного браузера, нижняя сам профиль ChIP-Seq

с комплексами SAGA и ORC, а также с комплексом ремоделирования dSWI/SNF, который вместе с комплексом SAGA участвует в формировании нужной структуры хроматина для правильного функционирования регуляторных элементов, включая промоторы. С этой целью мы использовали программное обеспечение собственной разработки по построению усредненного профиля исследуемого фактора на заданных сайтах генома [1]. Геномные профили белков ORC2, GCN5, OSA и гистона H3 были получены ранее в нашей лаборатории. Рассчитаны усредненные профили данных белков на всех 4709 сайтах посадки белка CG9890, а также на 4709 случайных промоторах и на 4709 случайных геномных сайтах (рис. 3).

Так как белок CG9890 локализован преимущественно на промоторах генов, то на сайтах связывания CG9890 можно будет найти обогащение любых промоторных факторов, включая комплексы SAGA, dSWI/SNF и ORC, относительно среднегеномного уровня. Однако, как можно видеть из рис. 3, белки GCN5 (комплекс SAGA), OSA (комплекс dSWI/SNF) и ORC2 (комплекс ORC) обогащены на сайтах связывания белка CG9890 не только по сравнению со среднегеномным уровнем, но и по сравнению со случайными промоторами. Полученный результат свидетельствует, что данная колокализация обусловлена не просто случайным совпадением на промоторах генов, а тем, что именно сайт связывания белка CG9890 способствует локализации комплексов SAGA, dSWI/SNF и ORC. Кроме того, как следует из рис. 3, сайты связывания белка CG9890 характеризуются более низкой нуклеосомной плотностью (представленностью гистона H3), чем в среднем по ге-

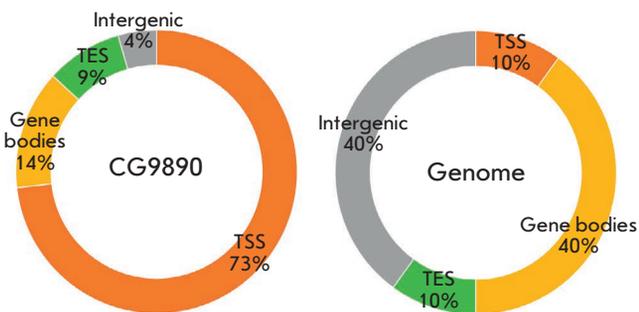
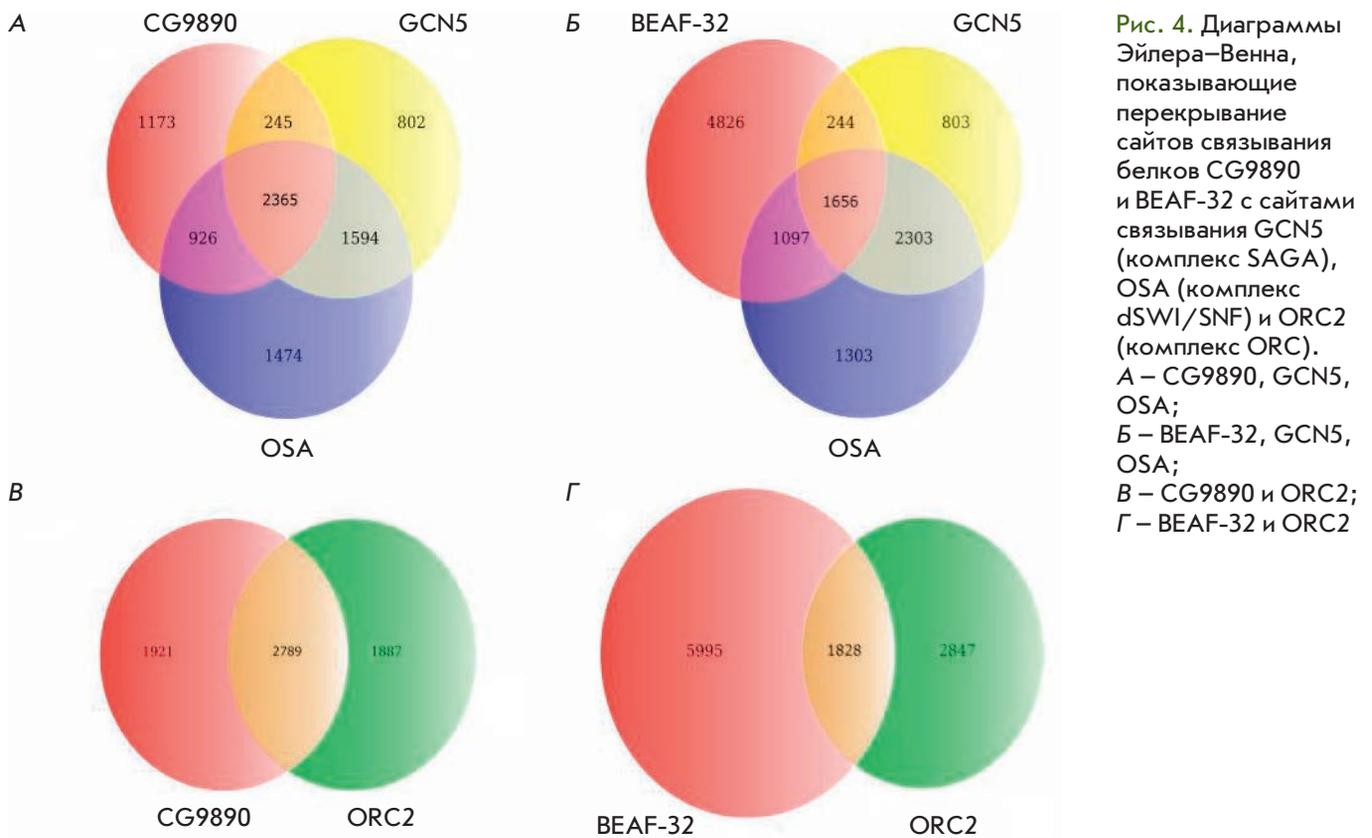
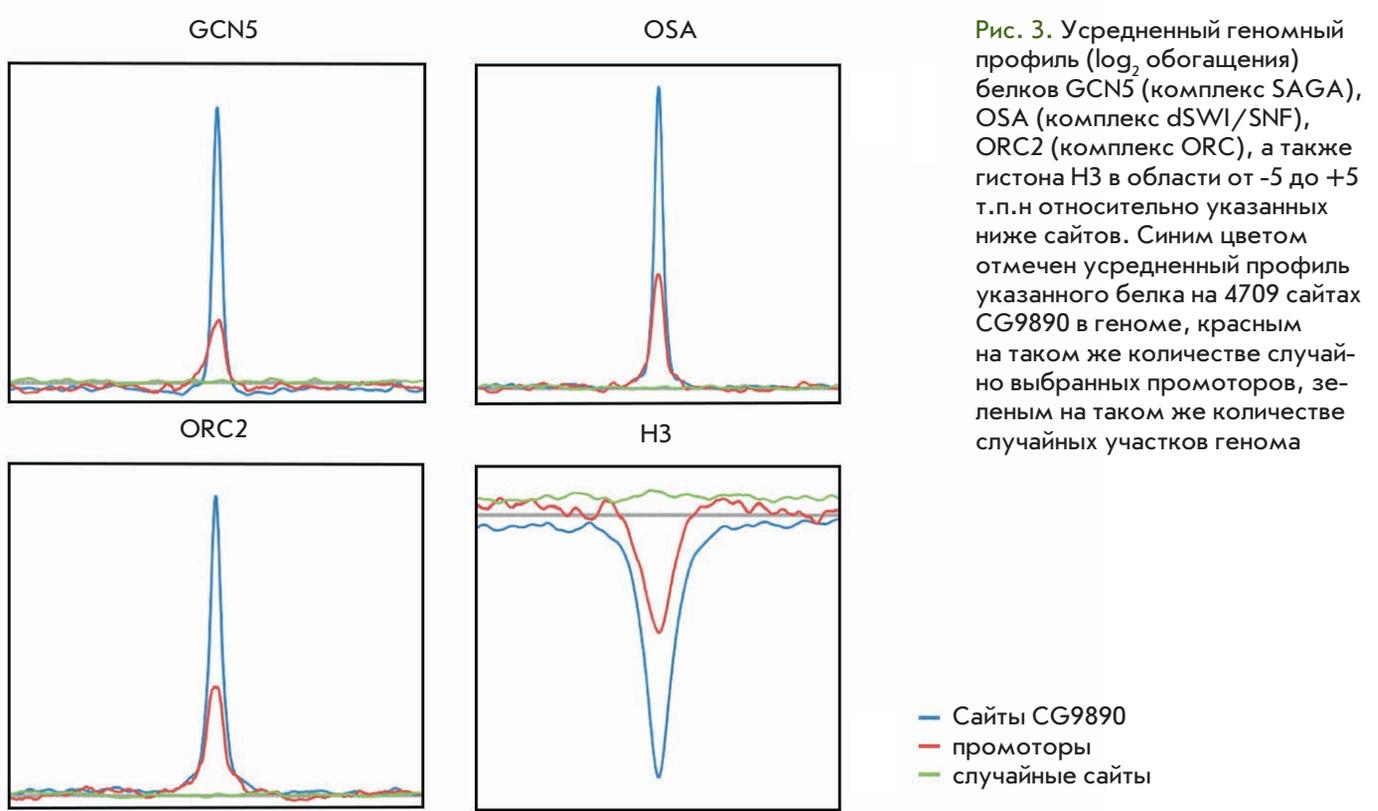


Рис. 2. Распределение сайтов связывания белка CG9890 относительно аннотированных элементов генома дрозофилы (левая картинка). Для сравнения показана относительная представленность всех аннотированных элементов в геноме (правая картинка). TSS – промоторная область, TES – конец гена, Gene bodies – область гена между TSS и TES, Intergenic – межгенные области

ному и на промоторах, что указывает на активное состояние данных регуляторных элементов.

С помощью второго подхода мы рассчитали количество сайтов белка CG9890, перекрывающихся с сайтами белков GCN5, OSA и ORC2. В качестве контрольного фактора был выбран хорошо известный промоторный белок BEAF-32 [18]. Координаты ChIP-Seq-пики для белка BEAF-32 получены из NCBI GEO (GSE35648). Пики двух белков считали пересекающимися при условии пересечения их геномных интервалов как минимум в 10 п.н. Полученные данные представлены на рис. 4.



Как можно видеть из *рис. 4*, около 60% сайтов белка CG9890 перекрываются с сайтами белка ORC2, субъединицы комплекса ORC, что, в свою очередь, составляет около 60% сайтов белка ORC2. Уровень перекрывания сайтов ORC2 с сайтами BEAF-32, другого фактора, локализирующегося на промоторах, существенно ниже, несмотря на то, что сайтов посадки белка BEAF-32 в геноме гораздо больше. Из *рис. 4* видно, что белок CG9890 колокализуется с белками GCN5 и OSA на половине своих сайтов посадки в геноме, что существенно выше аналогичного значения для контрольного белка BEAF-32.

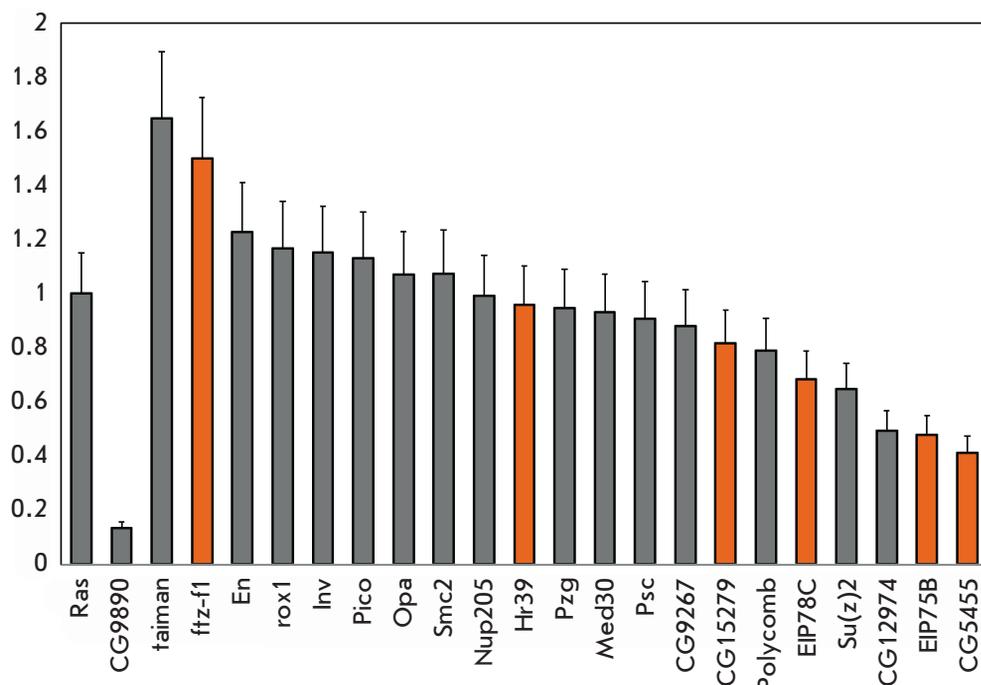
**Белок CG9890 участвует в регуляции экспрессии генов**

Ранее нами было показано, что белок CG9890 взаимодействует с белком ENY2, который координирует множество этапов регуляции экспрессии генов. Выявлено взаимодействие белка CG9890 с ENY2-содержащими комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPOC [16], т.е. комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции. Учитывая, что CG9890 найден преимущественно на промоторах генов, мы решили исследовать, к каким изменениям в экспрессии CG9890-ассоциированных генов приведет снижение внутриклеточного уровня белка CG9890 методом РНК-интерференции. В результате оптимизации условий РНК-интерференции удалось добиться эффективного уменьшения экспрессии из-

учаемого белка в клетках более чем в 5 раз по количеству мРНК и фактически полное истощение количества белка (ниже предела детекции методом вестерн-блоттинга).

Используя метод ОТ-кПЦР, мы проанализировали изменение уровня мРНК 21 CG9890-ассоциированного гена в клетках после РНК-интерференции по сравнению с контрольными образцами. Результаты этого эксперимента представлены на *рис. 5*. После нокдауна белка CG9890 количество мРНК семи из этих генов снизилось как минимум на 20%, а количество РНК трех генов возросло как минимум на 20%. Таким образом, белок CG9890 действительно участвует в регуляции экспрессии по крайней мере части генов, на промоторах которых он локализуется.

Среди 10 генов, экспрессия которых изменилась статистически значимо при РНК-интерференции белка CG9890, пять являются генами экдизонового каскада. Их транскрипция значительно активируется в процессе ответа на экдизон. Это дает возможность воспользоваться удобной модельной системой индукции клеток экдизоном для более детального изучения функционирования белка CG9890 в регуляции экспрессии этих генов. Преимущество этой системы состоит в том, что с ее помощью можно изучать динамические процессы индуцибельной регуляции экспрессии генов, а не только поддержание базальной транскрипции [19].



**Рис. 5.** Изменение уровней экспрессии CG9890-ассоциированных генов после РНК-интерференции белка CG9890. По оси ординат показано изменение уровня мРНК генов после РНК-интерференции относительно исходного уровня. За единицу принят исходный уровень. Для нормирования использовали содержание мРНК гена *Ras* в соответствующих образцах. Линии погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. Оранжевые столбики соответствуют генам экдизонового каскада

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе предыдущих исследований мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании точек начала репликации. Также мы обнаружили взаимодействие ENY2 с еще одним белком CG9890, который содержит домен цинковых пальцев, как и Su(Hw). Биохимическими методами показано взаимодействие белка CG9890 с ENY2-содержащими комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TНOC. Мы предполагаем, что, как и Su(Hw), белок CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя таким образом регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. В данной работе мы идентифицировали сайты связывания CG9890 в геноме и показали, что они локализованы преиму-

щественно на промоторах генов. Установлена полногеномная корреляция сайтов связывания CG9890 и ENY2-содержащих комплексов SAGA, ORC и dSWI/SNF. Сайты связывания белка CG9890 характеризуются более низкой нуклеосомной плотностью (представленностью гистона H3), чем в среднем по геному и в среднем на промоторах, что указывает на активное состояние данных регуляторных элементов. Белок CG9890 участвует в регуляции экспрессии части генов, на промоторах которых он находится, причем заметную долю этих генов составляют гены экдизонового каскада. Таким образом, белок CG9890 – это новый участник транскрипционной сети клетки, который локализуется на активных промоторах, взаимодействует с основными транскрипционными и репликационными комплексами и участвует в регуляции как базальной, так и индуцибельной транскрипции. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского  
научного фонда, грант № 20-14-00269.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730.
- Mazina M., Vorob'eva N.E., Krasnov A.N. // Tsitologiya. 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
- Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Kuzmina J.L., Panov V.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Cell Cycle. 2011. V. 10. № 11. P. 1821–1827.
- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // Mol. Cell. 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
- Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Ramensky V.E., Mardanov P.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 20. P. 6654–6661.
- Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., Nabirochkina E., Krasnov A., Shidlovskii Y., Georgieva S., Kopytova D. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 21. P. 10689–10700.
- Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., Shidlovskii Y., Nabirochkina E., Brechalov A., Georgiev G., Georgieva S. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 10. P. 4920–4933.
- Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., Tretyakov G., Kharchenko P.V., MacAlpine D.M. // Genome Res. 2011. V. 21. № 2. P. 164–174.
- Masai H., Matsumoto S., You Z., Yoshizawa-Sugata N., Oda M. // Annu. Rev. Biochem. 2010. V. 79. P. 89–130.
- MacAlpine H.K., Gordan R., Powell S.K., Hartemink A.J., MacAlpine D.M. // Genome Res. 2010. V. 20. № 2. P. 201–211.
- Baptista T., Grunberg S., Minoungou N., Koster M.J.E., Timmers H.T.M., Hahn S., Devys D., Tora L. // Mol. Cell. 2017. V. 68. № 1. P. 130–143.
- Shi J., Zheng M., Ye Y., Li M., Chen X., Hu X., Sun J., Zhang X., Jiang C. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 15. P. 9730–9739.
- Harikrishnan K.N., Chow M.Z., Baker E.K., Pal S., Bassal S., Brasacchio D., Wang L., Craig J.M., Jones P.L., Sif S., et al. // Nat. Genet. 2005. V. 37. № 3. P. 254–264.
- Elfring L.K., Daniel C., Papoulas O., Deuring R., Sarte M., Moseley S., Beek S.J., Waldrip W.R., Daubresse G., DePace A., et al. // Genetics. 1998. V. 148. № 1. P. 251–265.
- Fursova N.A., Nikolenko J.V., Soshnikova N.V., Mazina M.Y., Vorobyova N.E., Krasnov A.N. // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 4. P. 110–114.
- Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Park P.J. // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. № 12. P. 1351–1359.
- Zhao K., Hart C.M., Laemmli U.K. // Cell. 1995. V. 81. № 6. P. 879–889.
- Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Fursova N.A., Nedil'ko P.N., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // Cell Cycle. 2015. V. 14. № 22. P. 3593–3601.

УДК 578.821

# Влияние повышенной продукции внеклеточных вирионов вируса осповакцины на его свойства при инфицировании мышей

С. Н. Щелкунов\*, С. Н. Якубицкий, Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев, И. А. Юрганова, Д. А. Одношевский, И. В. Колосова, С. А. Пьянков, О. С. Таранов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., Кольцово, 630559 Россия

\*E-mail: snshchel@rambler.ru; snshchel@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020

Принята к печати 10.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10972

**РЕФЕРАТ** Современный подход к созданию аттенуированных противооспенных вакцин обычно предполагает направленную инактивацию генов вирулентности вируса осповакцины (VACV). Нами изучено влияние увеличения продукции внеклеточных вирионов, покрытых оболочкой (EEV), на вирулентные и иммуногенные свойства VACV в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей. Исследования проводили на штамме LIVP VACV, принятом в России для противооспенной вакцинации. В состав гена A34R VACV направленно ввели две точечные мутации, приводящие к статистически значимому повышению формирования EEV по сравнению с родительским штаммом LIVP. Мутантный штамм LIVP-A34R проявлял меньшую нейровирулентность и при внутрикожном введении индуцировал повышенную продукцию противовирусных антител. Такой вариант VACV может стать основой для получения аттенуированной и высокоиммуногенной вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, а также использоваться в качестве вектора для конструирования живых рекомбинантных поливалентных вакцин против разных инфекционных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** оспа, вакцина, иммуногенность, вирулентность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БОЕ – бляшкообразующая единица; ФР – физиологический раствор; CEV – вирион, ассоциированный с клеткой; EEV – внеклеточный вирион, покрытый оболочкой; IMV – внутриклеточный зрелый вирион; VACV – вирус осповакцины.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входит в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Этот род объединяет такие вирусы животных, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV), вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV) и некоторые другие [1, 2]. Ортопоксвирусы являются крупнейшими сложно организованными ДНК-содержащими вирусами млекопитающих, и весь цикл их развития проходит в цитоплазме инфицированных клеток. Представители этого рода морфологически неразличимы и антигенно близки друг другу. Поэтому инфекция одним видом ортопоксвирусов обеспечивает иммунную защиту от других представителей данного рода [3]. Именно поэтому использование живой вакцины на основе разных штаммов VACV позволило искоренить оспу [1, 4].

VACV, как и другие виды ортопоксвирусов, существует в двух инфекционных формах. Подавляющее большинство вирусного потомства составляют внутриклеточные зрелые вирионы (intracellular mature virion, IMV), гораздо меньшую часть – внеклеточные оболочечные вирионы (extracellular enveloped virion, EEV) [5, 6]. IMV накапливаются в зараженной клетке в большом количестве и попадают в окружающую среду только после разрушения клетки. Небольшой процент синтезируемых вирусных частиц покрывается дополнительной липопротеиновой оболочкой и на раннем этапе цикла развития вируса выходит на поверхность клеток, где находится в ассоциированном с клеткой состоянии (cell-associated enveloped virion, CEV). Часть таких частиц отделяется от клеток и находится в свободном виде (EEV) [7]. Форма EEV составляет менее 1% всего потомства большинства штаммов VACV [5]. При этом EEV проника-

ет в клетки эффективнее IMV [7, 8] и обеспечивает быстрое распространение вируса в организме [5, 9]. Влияние повышенной продукции EEV на иммуногенность VACV подробно до сих пор не изучали.

Штаммы VACV могут значительно различаться по уровню продукции EEV [6, 10]. Штамм IHD-J (International Health Department-J) относится к наиболее подробно изученным вариантам VACV с высоким выходом EEV при заражении культур клеток [6]. Одним из генов, контролирующим высвобождение CEV в свободную форму EEV, является ген A34R [10]. Белок A34, входящий в состав липопротеиновой оболочки EEV, отсутствует в IMV. При этом оказалось, что аминокислотная последовательность белка A34 нейровирулентного адаптированного к мышам штамма WR (Western Reserve) VACV (образование менее 1% EEV от инфекционного потомства вируса на культуре клеток) отличается от последовательности этого белка штамма IHD-J (до 30% EEV) лишь двумя точечными заменами – Asp110 → Asn и Lys151 → Glu [10]. Показано, что замена гена A34R в штамме WR VACV на ген из штамма IHD-J существенно увеличивает выход EEV [9, 10].

Экспериментально доказано, что увеличенная продукция EEV, обусловленная введением мутаций в ген A34R, приводит к более эффективной диссеминации онколитических вариантов VACV и улучшенной противоопухолевой активности таких вирусов *in vivo* [9, 11]. Однако влияние этих мутаций на вирулентность и иммуногенность VACV не изучено.

Прекращение противооспенной вакцинации после 1980 года [2–4] привело к ситуации, когда современная человеческая популяция не защищена от возрождающихся ортопоксвирусных инфекций [12]. Поэтому важное значение приобретают исследования, направленные на создание новых аттенуированных и высокоиммуногенных вакцин на основе VACV [4].

VACV активно используется не только для получения безопасных живых вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека, но и в качестве молекулярного вектора при конструировании живых рекомбинантных поливалентных вакцин против различных инфекционных заболеваний [3, 6, 12–14]. При этом важным направлением является изучение влияния разных вирусных генов и их мутантных вариантов на иммуногенность и безопасность создаваемых вакцин.

Цель данной работы состояла в получении штамма LIVP VACV с мутациями в гене A34R, приводящими к увеличенной продукции EEV-формы, и изучении вирулентных и иммуногенных свойств варианта LIVP-A34R в сравнении с исходным штаммом вируса LIVP при инфицировании мышей разными способами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Вирус, культуры клеток

В работе использовали клоновый вариант 14 штамма LIVP VACV, ранее описанный нами [15], и перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и Vero из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток CV-1 как описано [16]. Культуру клеток Vero использовали в тесте вируснейтрализации сывороток крови мышей.

### Получение VACV с точечными мутациями в гене A34R

Методом ПЦР с синтетическими олигонуклеотидными праймерами в нуклеотидную последовательность гена A34R ввели две точечные мутации, приводящие к синтезу белка, соответствующего белку A34 штамма IHD-J VACV (замены Asp110 → Asn и Lys151 → Glu) [17]. Рекомбинантный штамм LIVP-A34R с мутантным геном A34R получали на основе клонового варианта 14 штамма LIVP VACV с использованием плазмиды pMGCgpt-A34R\* по ранее описанному методу [15].

### Животные

В исследованиях использовали инбредных разнополых мышей линии BALB/c, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [18]. Манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

### Оценка нейровирулентности штаммов VACV

Мышам-сосункам (2–3-дневным) интрацеребрально вводили рекомбинантный штамм LIVP-A34R или исходный клоновый вариант LIVP, разведенные в физиологическом растворе (ФР), в дозе 10 БОЕ/10 мкл/мышь. Животным контрольной группы вводили равный объем ФР. За мышами наблюдали в течение 12 сут, учитывая количество погибших.

### Инфицирование мышей

Использовали 3–5-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г. Препараты вирусов LIVP, LIVP-A34R или ФР вводили животным интраназально (и/н), подкожно (п/к) или внутрикожно (в/к)

согласно [16]. Использовали дозы заражения  $10^8$ ,  $10^7$  или  $10^6$  БОЕ/30 мкл/животное. В каждой группе экспериментальных животных было по 5–6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания (взъерошенность шерсти, адинамия, тремор) в течение 14 сут.

#### **Получение сывороток крови экспериментальных животных**

Через 28 сут после введения препаратов VACV проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров, после чего мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации. Путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием получена сыворотка крови мышей. Индивидуальные образцы сывороток хранили при температуре минус  $20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Иммуноферментный анализ сывороток крови (ИФА)**

ИФА индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно [16]. В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам, рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

#### **Определение титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови**

Титры антител к штамму LIVP VACV в образцах сыворотки крови мышей оценивали в реакции нейтрализации (РН) по уменьшению количества бляшек в монослое культуры клеток Vero согласно [19]. Сыворотки крови перед постановкой РН инактивировали в течение 30 мин при  $56^{\circ}\text{C}$ . Готовили 4–5-кратные разведения образцов сыворотки, начиная с разведения 1 : 10, в поддерживающей среде культивирования клеток. В качестве рабочего разведения VACV использовали то разведение, которое в объеме 0.1 мл содержало 30–60 БОЕ. Разведения сыворотки и VACV смешивали в равных объемах, инкубировали в течение 1 ч при температуре  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , вносили по 0.2 мл на монослой клеток Vero в 24-луночных планшетах, добавляли по 0.8 мл поддерживающей среды и культивировали в течение 3 сут в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. После окончания срока культивирования монослой окрашивали раствором генцианового фиолетового и подсчитывали количество бляшек в лунках.

#### **Патоморфологический и вирусологический анализ органов**

Забор органов (легкие, мозг, печень, почки, селезенка) и проб тканей (носовая перегородка или образцы кожи из места введения препарата) осуществляли через 3, 7, 10 сут после введения мышам препаратов вирусов или ФР, предварительно проведя процедуру эвтаназии методом цервикальной дислокации. В каждой временной точке образцы органов и тканей брали от трех животных и анализировали индивидуально.

Для патоморфологического исследования органы мышей фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma, США) в течение 48 ч. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в растворах спиртов возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилोल–парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

Для вирусологического исследования готовили 10% гомогенаты органов и тканей мышей методом механической дезинтеграции с помощью стальных шариков и гомогенизатора с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. В полученных гомогенатах после нескольких актов замораживания–оттаивания определяли титры вирусов на монослое культуры клеток CV-1 методом бляшек [15].

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

##### **Продукция EEV-формы штаммами VACV LIVP и LIVP-A34R**

Поскольку EEV VACV выходит из клетки до того, как произойдет лизис первично зараженной клетки и все инфекционные формы вируса окажутся в межклеточном пространстве, провели эксперименты, в которых оценили содержание вируса в зараженных клетках и надклеточной жидкости в зависимости от времени после инфицирования. Монослой клеток CV-1 в шестилуночных планшетах заражали VACV LIVP или полученным на его основе мутантным LIVP-A34R с множественностью 1 БОЕ/клетка, после чего каждые 3 ч в течение 1 сут отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а клетки в оставшейся питательной среде подвергали двум циклам замораживания–оттаивания. В полученных образцах определяли титр вируса методом бляшек. Каждую точку отбора снимали в трех повторностях.

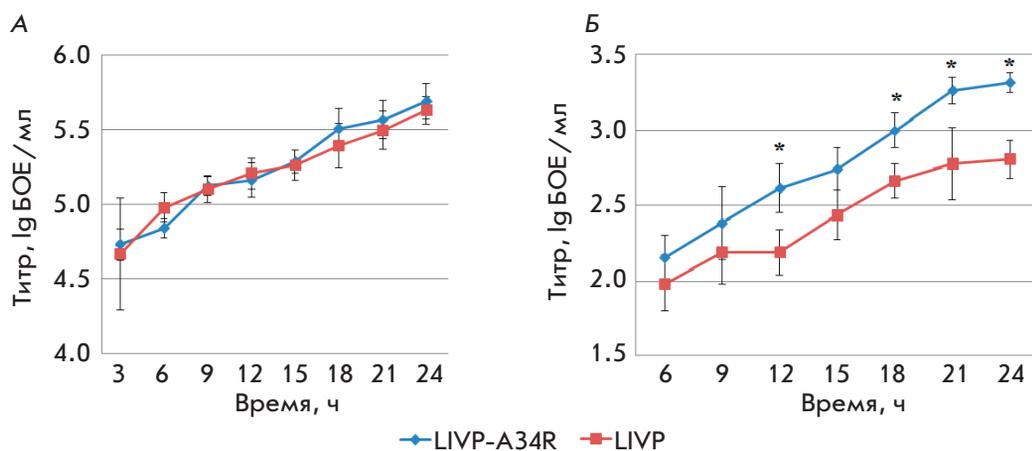


Рис. 1. Динамика размножения разных вариантов VACV в культуре клеток линии CV-1. А – биосинтез внутриклеточной IMV-формы; Б – накопление в надклеточной среде EEV-формы вирионов. \* – различия статистически значимы при  $p > 0.1$

Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 1, показывают, что мутантный LIVP-A34R не отличается от исходного LIVP по уровню синтеза IMV-формы вируса (рис. 1А), в то время как EEV-форма продуцируется в достоверно большем количестве по сравнению с LIVP (рис. 1Б). Точное процентное соотношение IMV- и EEV-форм в суммарном урожае вирусов не определяли.

### Патогенность штаммов VACV при разных способах введения мышам

Для сравнительного изучения влияния способа инфицирования и дозы вводимого вирусного препарата на проявление патогенных свойств штаммов VACV LIVP и LIVP-A34R мышей заражали тремя наиболее популярными (близкими к естественным) способами: и/н, в/к или п/к. Инфицирующие дозы каждого вируса были  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  БОЕ/животное. Поскольку инфицирование взрослых мышей большинством штаммов VACV обычно не приводит к гибели животных, патогенность вариантов этого вируса изучают по изменению массы тела после заражения и клиническим проявлениям заболевания (взъерошенность шерсти, адинамия, тремор) [20, 21].

Выраженные клинические проявления инфекции и временное снижение массы тела наблюдали только при и/н инфицировании мышей обоими штаммами VACV (рис. 2). Пик заболевания приходился на 6–8 сут после заражения. С увеличением дозы вирусов фиксировали более явные клинические признаки инфекции и большее снижение массы тела мышей. Как видно из рис. 2, при дозах  $10^6$  и  $10^7$  БОЕ мутантный штамм LIVP-A34R проявлял меньшую патогенность.

При в/к введении обоих штаммов клинические проявления инфекции у мышей не выявлялись. Динамика массы тела инфицированных мышей при этом практически не отличалась от контрольных животных (рис. 3). Аналогичные результаты полу-

чены и при п/к заражении мышей (данные не приведены).

### Диссеминация вирусов в организме мышей

Из изъятых на 3, 7 и 10 сут после заражения образцов органов и тканей животных, инфицированных и/н, в/к или п/к штаммами LIVP или LIVP-A34R в дозах  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  БОЕ/животное, были приготовлены 10% гомогенаты, в которых методом бляшек определяли титры вирусов на культуре клеток CV-1. Анализировали образцы легких, головного мозга, печени, селезенки и почек. При и/н введении дополнительно исследовали носовую перегородку со слизистой, а в группах с в/к или п/к инъекцией – лоскуты кожи из места введения вируса.

При и/н способе введения вирусы были обнаружены во всех исследуемых органах: больше всего в слизистой носовой перегородки (первичный очаг размножения), затем по убывающей – в легких, головном мозге, печени (рис. 4), почках и селезенке.

При в/к введении вирусы выявляли только в образцах кожи из места инъекции вирусных препаратов, а также при максимальной инфицирующей дозе ( $10^8$  БОЕ) – у некоторых животных в легких и печени на 3 и 7 сут после заражения (данные не приведены). При этом в легких мутантный вариант LIVP-A34R встречался в больших количествах по сравнению с исходным LIVP. В образцах головного мозга, селезенки и почек детектируемых уровней вирусов не обнаружено.

У зараженных п/к исследуемыми вариантами VACV животных вирусы обнаружены только в образцах кожного лоскута из места введения вирусных суспензий при максимальной заражающей дозе. В образцах внутренних органов вирусы не выявлены.

### Патоморфологический анализ органов мышей

Патологические изменения органов, наблюдаемые у животных экспериментальных групп, в целом со-

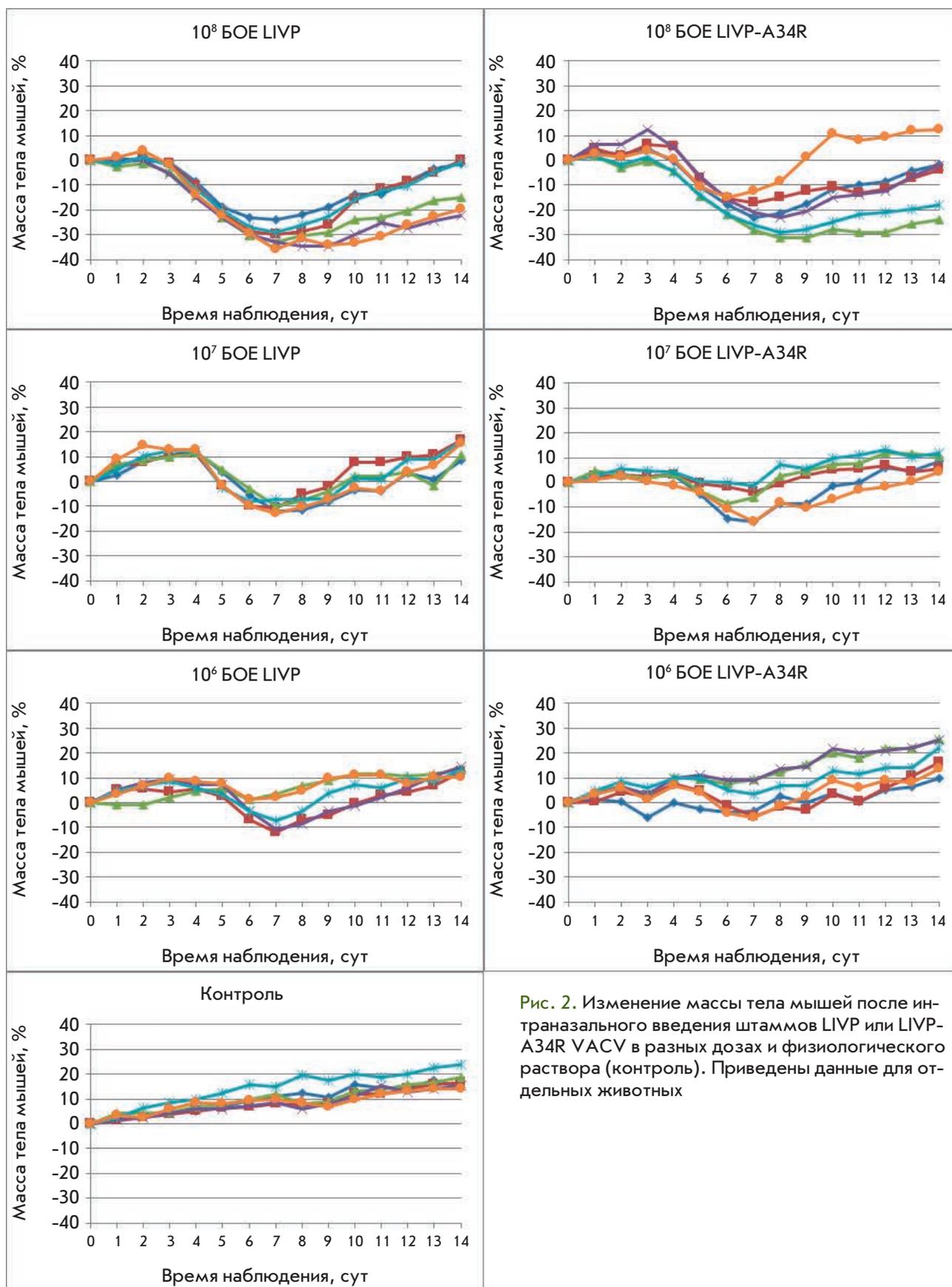


Рис. 2. Изменение массы тела мышей после интраназального введения штаммов LIVP или LIVP-A34R VACV в разных дозах и физиологического раствора (контроль). Приведены данные для отдельных животных

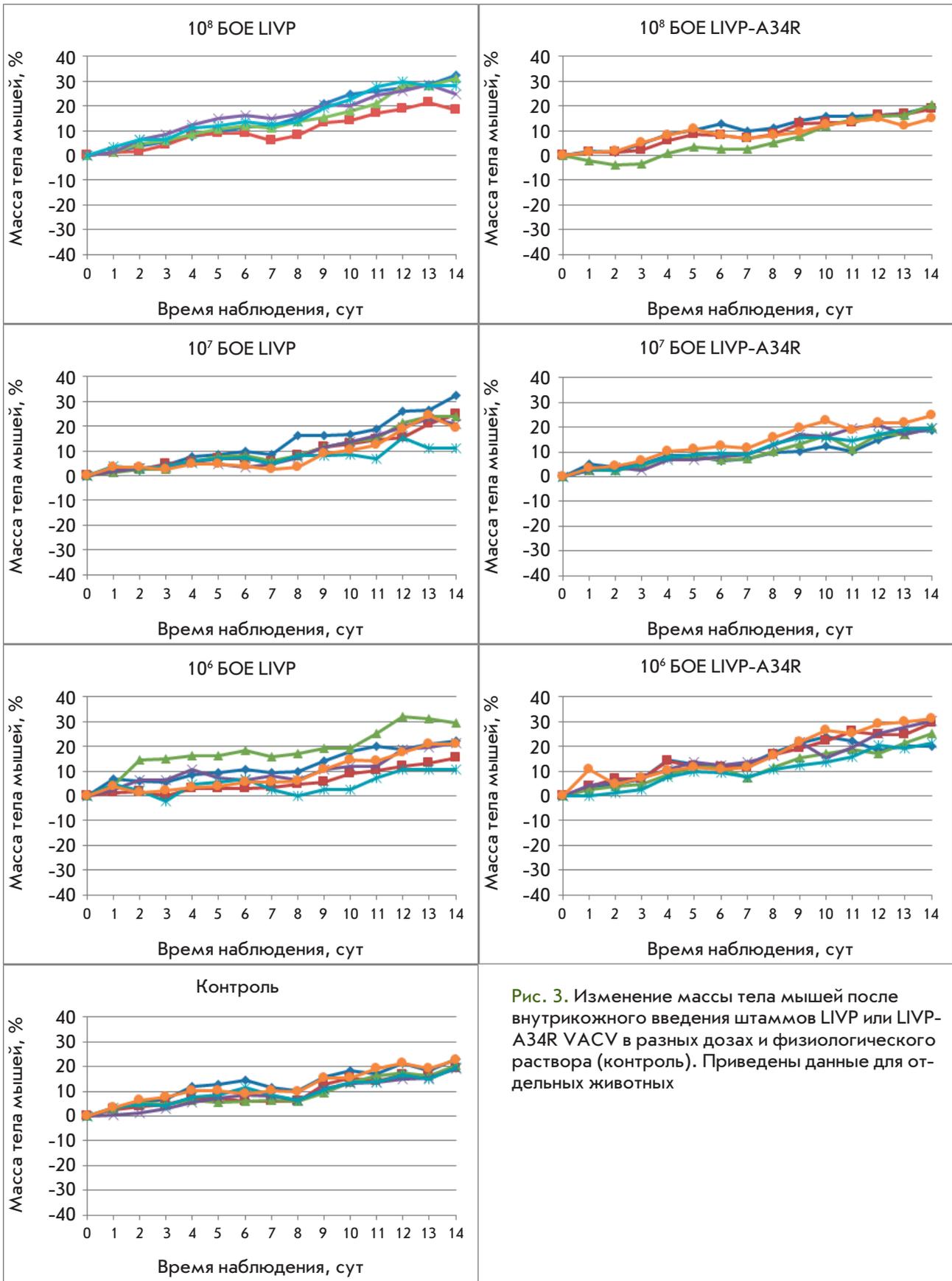


Рис. 3. Изменение массы тела мышей после внутрикожного введения штаммов LIVP или LIVP-A34R VACV в разных дозах и физиологического раствора (контроль). Приведены данные для отдельных животных

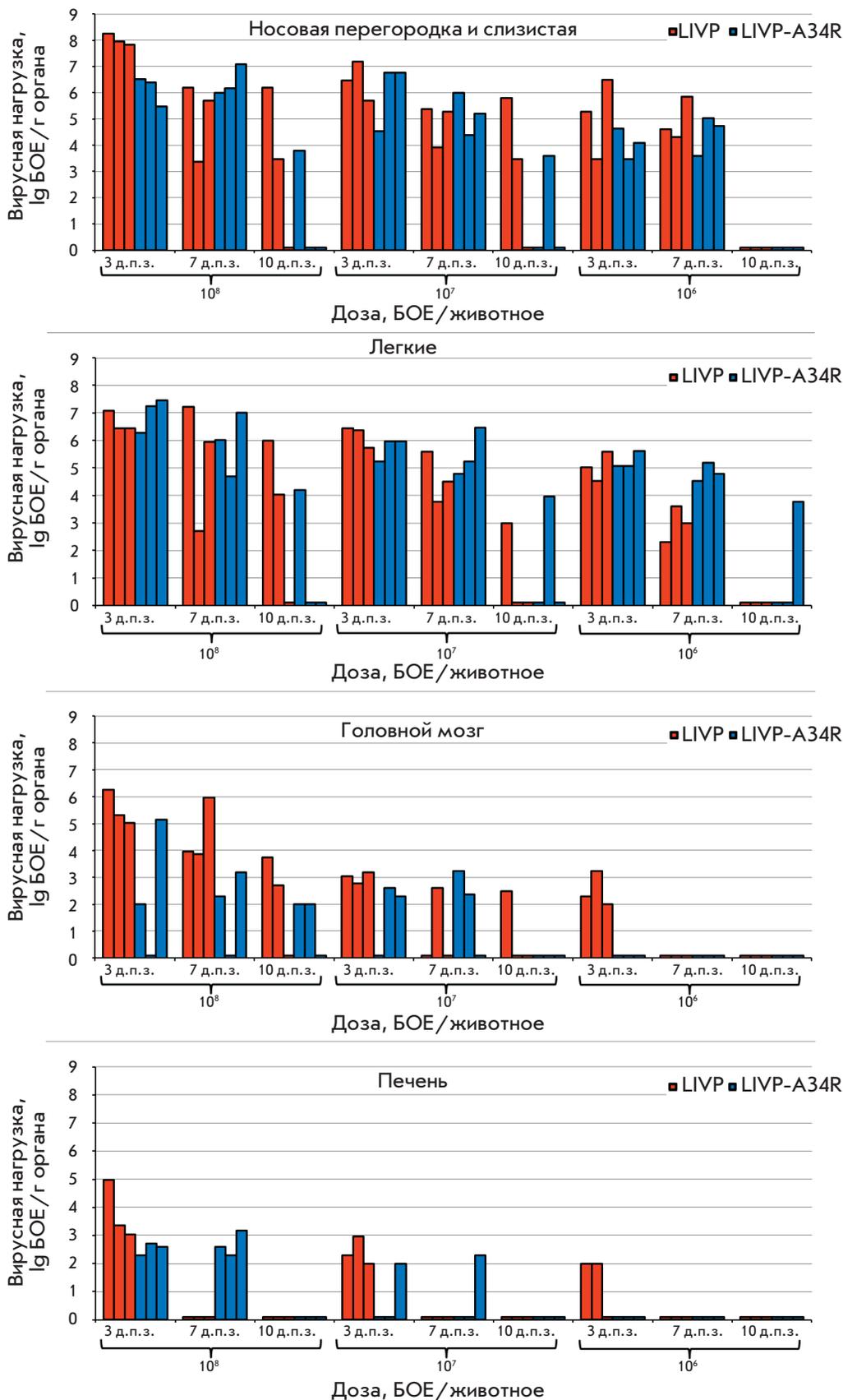


Рис. 4. Накопление VACV в органах и тканях мышей, интраназально зараженных штаммами L1VP или L1VP-A34R в разных дозах. Приведены данные для отдельных животных. д.п.з. — день после заражения

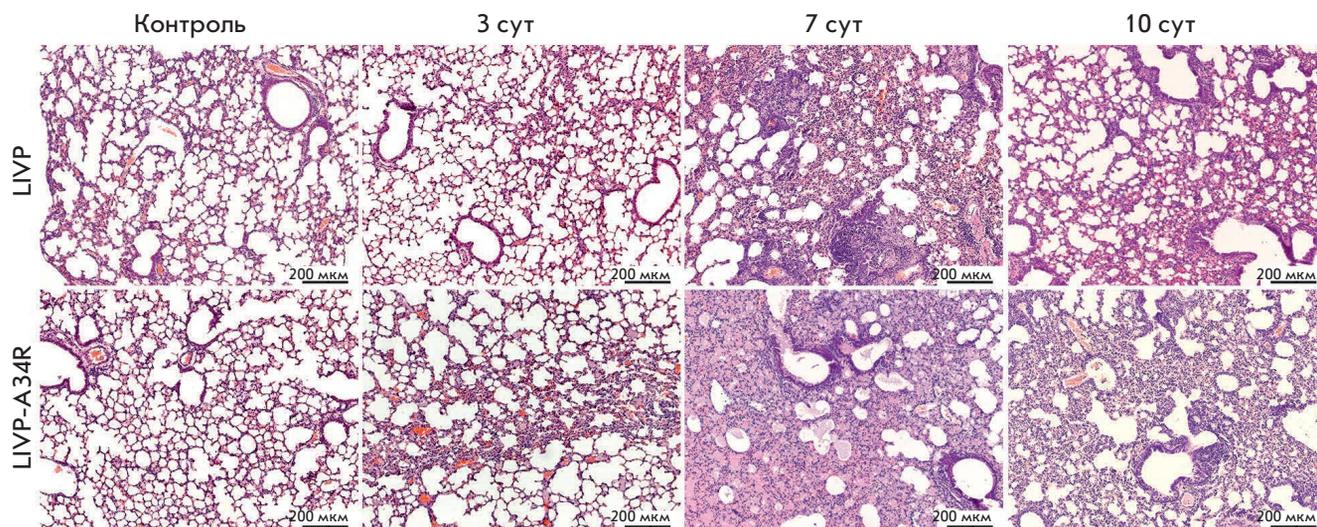


Рис. 5. Динамика развития патологического процесса в респираторной ткани при интраназальном заражении в дозе  $10^7$  БОЕ (см. пояснения в тексте). Гистологический препарат легких. Окраска гематоксилином и эозином

ответствовали гистологической картине поражений при заражении лабораторных животных ортопоксвирусами [22], что подтверждало адекватность выбранной модели. Степень выраженности и распространенность патологических изменений варьировала в зависимости от штамма вируса, дозы заражения и способа введения препарата.

Наиболее типичные патоморфологические манифестации инфекции локализовались в органах дыхания, преимущественно в легких. В респираторной ткани отмечен выраженный отек межальвеолярных перегородок, гиперемия капилляров, активный выход форменных элементов и плазмы крови в альвеолярные пространства. В наиболее тяжелых случаях экссудация сопровождалась дистрофическими и некробиотическими изменениями альвеолярного эпителия, скоплением фибрина, воспалительно-клеточной инфильтрацией смешанного характера (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы в небольшом количестве). Макрофаги встречались редко, в основном при и/н заражении в дозе  $10^8$  БОЕ.

При и/н заражении штаммом LIVP-A34R на 3 сут на 1/5–1/4 площади среза наблюдалось снижение воздушности легочной ткани, слабовыраженный отек, гиперемия, умеренная инфильтрация стромы лимфоцитами и нейтрофилами. При заражении штаммом LIVP изменения в легких на 3 сут были минимальными (рис. 5). Наиболее выраженные патоморфологические признаки заболевания наблюдались на 7 сут с момента заражения: распространенный, выраженный отек межальвеолярных перегородок, полиморфно-клеточная инфильтрация, резкая гиперемия и тромбоз сосудов микроцирку-

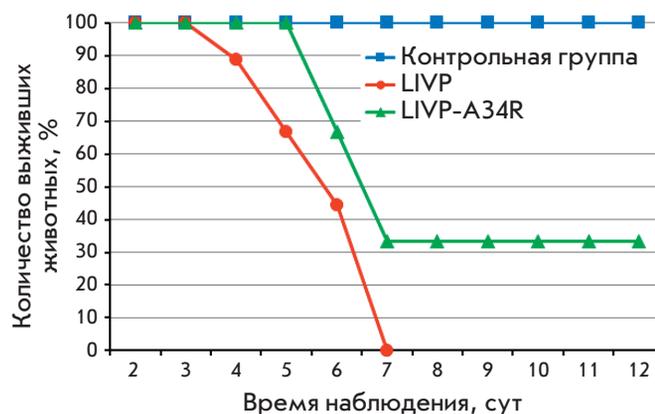
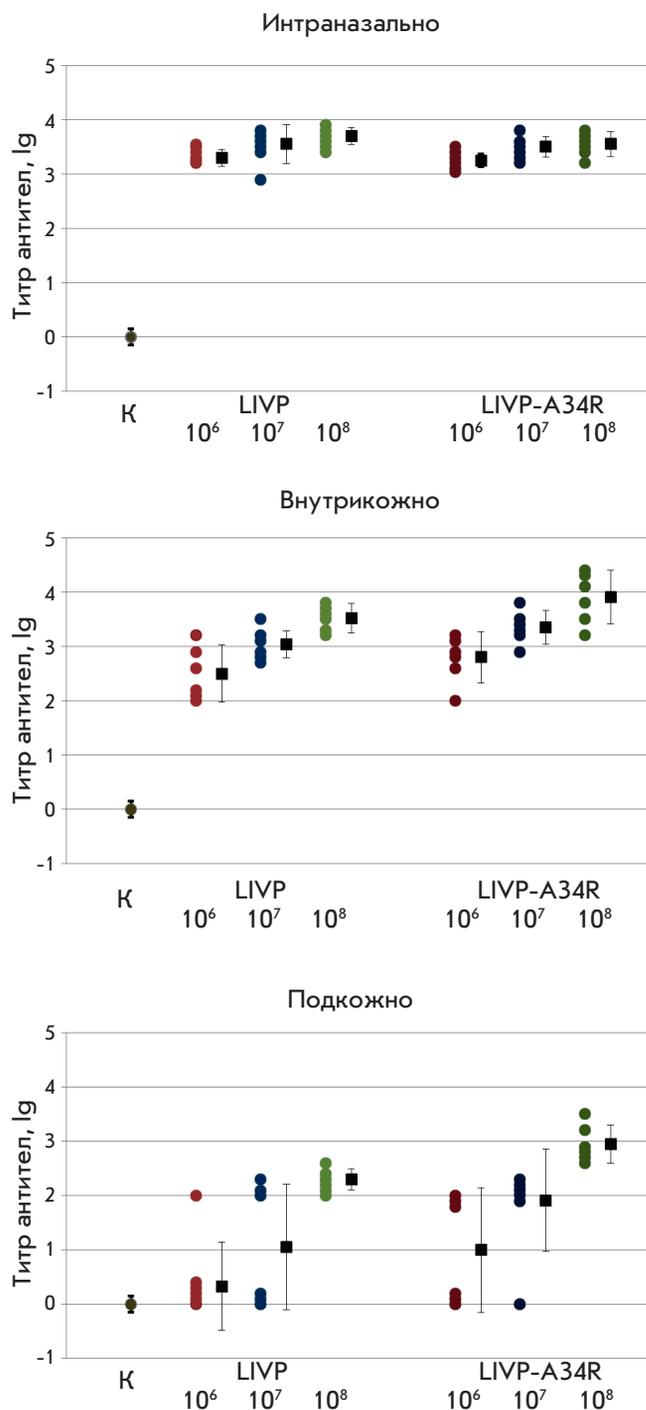


Рис. 6. Динамика гибели новорожденных мышей при интрацеребральном заражении штаммами LIVP или LIVP-A34R VACV

ляторного русла, очаги некроза в соединительной ткани, окружающей крупные бронхи и кровеносные сосуды. При инфицировании штаммом LIVP-A34R более выражена плазморрагия и выпот фибрина в просвет альвеол. Патологические проявления на 10 сут были умеренными.

Патологические изменения со стороны трахеи и бронхов были выражены слабо и проявлялись в основном в виде редких локусов дистрофических изменений эпителия, утолщения стенки бронхов небольшого калибра, умеренно выраженного отека межклеточных пространств, редко – десквамации эпителиального слоя с развитием эрозивной поверхности. Довольно редко и только при и/н заражении наблюдалась умеренная перибронхиальная и периваскулярная полиморфно-клеточная инфильтрация.



**Рис. 7.** Уровни определенных в ИФА VACV-специфических антител сывороток крови мышей, инфицированных разными способами и штаммами LIVP или LIVP-A34R в различных дозах. В каждой группе приведены данные для отдельных животных, а также средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG и доверительные интервалы для уровня вероятности 95%

При в/к или п/к заражении бронхи в патологический процесс практически не вовлекались.

### Нейровирулентность вариантов VACV

Способность вирусов вызывать гибель при интрацеребральном заражении изучали на трех группах новорожденных мышей (по 10 особей каждая), за которыми вели наблюдение в течение 12 сут после инфицирования. В группе животных, зараженных VACV LIVP в дозе 10 БОЕ/мышь, гибель началась на 4-е сут и к 7-м все животные погибли. В группе мышей, инфицированных такой же дозой мутантного варианта LIVP-A34R, гибель началась на 6-е сут, после 7-х прекратилась, и треть животных выжила (рис. 6). В контрольной группе (инъекция ФР) смертности животных не наблюдали.

### Иммуногенная активность штаммов VACV

Иммуногенность вариантов VACV LIVP и LIVP-A34R оценивали по уровню индуцируемых ими вирусспецифических (в тесте ИФА) и вируснейтрализующих антител (по снижению инфекционности препарата VACV) в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после инфицирования тремя разными способами и разными дозами вирусов (10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> или 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь).

В реакциях ИФА в качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP, представляющий собой IMV-форму вируса. Результаты ИФА, приведенные на рис. 7, показывают, что при и/н заражении высокий уровень антител к вирионным белкам IMV-формы VACV детектируется как при высокой дозе инфицирования (10<sup>8</sup> БОЕ), так и при более низких дозах вируса. Следует отметить, что достоверных различий между штаммами LIVP и LIVP-A34R по данному показателю не выявлено.

Самые низкие уровни VACV-специфических антител зарегистрированы при п/к введении вирусов. При этом наблюдалась выраженная зависимость продукции антител от дозы инфицирующего вируса. Причем мутантный LIVP-A34R обуславливал более высокую продукцию вирусспецифических антител по сравнению с исходным штаммом VACV LIVP (рис. 7).

При в/к инъекции уровень VACV-специфических антител при инфицирующей дозе 10<sup>8</sup> БОЕ был соизмерим с уровнем антител при этой же дозе и/н введения вирусов. При уменьшении дозы в/к инфицируемого вируса биосинтез вирусспецифических антител снижается более заметно, чем при и/н способе заражения (рис. 7). При этом средние значения титра антител были выше в сыворотках крови мышей, инфицированных LIVP-A34R.

При анализе уровня вируснейтрализующих антител получили картину, схожую с данными ИФА, но имеющую некоторые отличия (рис. 8). Наибольшая продукция вируснейтрализующих антител зарегистрирована при и/н введении вирусов. При этом штамм LIVP индуцировал более высокий уровень антител по сравнению с мутантным LIVP-A34R. Наименьший иммунный ответ выявлен при п/к инъекции вирусов. При в/к введении вирусов нейтрализующие антитела синтезировались на относительно высоком уровне, при этом штамм LIVP-A34R обеспечивал более эффективную продукцию таких антител по сравнению со штаммом LIVP.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Самым надежным способом профилактики вирусных инфекций является вакцинация, которая была введена в практику здравоохранения более 200 лет назад при разработке методов защиты от натуральной оспы [1, 6]. Классическую противосспенную живую вакцину получали размножением VACV на коже телят или других домашних животных. Эта вакцина обеспечивала надежную защиту от оспы, но в ряде случаев наблюдались тяжелые побочные поствакцинальные реакции, в том числе в виде энцефалитов и энцефаломиелитов, иногда с летальным исходом [1, 2]. Поэтому после объявления Всемирной организацией здравоохранения в мае 1980 года о ликвидации оспы, вакцинация против этого особо опасного инфекционного заболевания человека была прекращена. Это привело к тому, что в настоящее время огромная часть населения Земли не имеет иммунитета не только против натуральной оспы, но и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций, таких, как оспа обезьян, оспа коров, оспа верблюдов и вакциния. Отсутствие иммунной прослойки существенно облегчает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции [23–27]. Особую тревогу вызывает оспа обезьян у человека, имеющая клиническую картину, напоминающую натуральную оспу, и летальность до 10%. Более того, в последние годы эффективность передачи вируса оспы обезьян среди людей многократно возросла [23, 25].

Чтобы предотвратить развитие небольших вспышек ортопоксвирусных инфекций в распространенные эпидемии и уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [3, 6, 28].

Современный подход к созданию аттенуированных высокоиммуногенных вакцин обычно состоит в направленной инактивации генов вирулентности VACV [6, 15, 29–31]. Кроме того, свойства патоген-

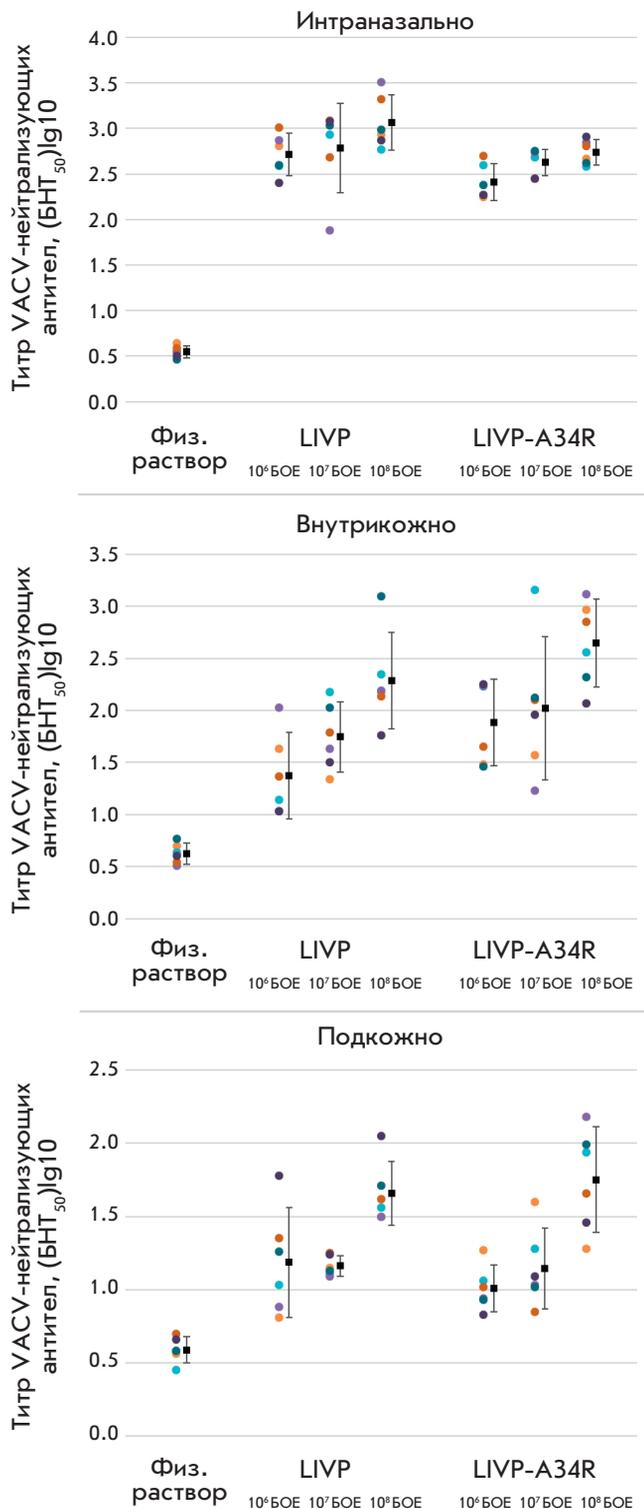


Рис. 8. Уровни VACV-нейтрализующей активности сывороток, полученных на 28 сут после инфицирования мышей разными способами и различными дозами штаммов LIVP или LIVP-A34R. В каждой группе приведены данные для отдельных животных, а также средние геометрические значения логарифмов обратного титра вируснейтрализации и доверительные интервалы для уровня вероятности 95%

ности и иммуногенности VACV зависят от используемого штамма вируса и способа его введения в организм животного [2, 6, 32–35].

Ранее на лабораторных штаммах VACV было показано, что ген A34R VACV является одним из важных генов, контролирующих отделение внеклеточных вирионов CEV, связанных с поверхностью инфицированной клетки, от клетки и переход их в окружающую среду в виде так называемой EEV-формы [7, 10]. Ген A34R кодирует гликопротеин с лектиноподобным доменом, входящий в состав внешней мембраны EEV VACV [7, 10, 36]. Оказалось, что белок A34 штамма WR VACV, продуцирующего в культуре клеток менее 1% вирусного потомства в виде EEV, отличается от аналогичного белка штамма INH-J, в потомстве которого EEV-форма может составлять до 30–40%, лишь двумя аминокислотными остатками в позициях 110 и 151. Замена в штамме WR гена A34R на вариант этого гена штамма INH-J приводит к значительному увеличению продукции EEV-формы, но уровень выхода EEV, характерный для штамма INH-J VACV, при этом не достигался [10]. Белок A34 выполняет свои функции по высвобождению из клеток EEV, взаимодействуя с рядом других вирусных и клеточных белков [37], и обеспечивает эффективное связывание EEV с клеткой и проникновение в нее [8, 38].

Полагают, что С-концевой лектиноподобный домен вирусного гликопротеина A34, находящийся на поверхности внеклеточных вирионов (CEV и EEV), обеспечивает высокоспецифичное взаимодействие этого белка (и вирионов) с углеводами на поверхности клеток [10]. Замена Lys151 → Glu в составе этого домена белка A34, по-видимому, снижает эффективность связывания выходящих из клетки вирионов VACV с поверхностью клетки и увеличивает выход EEV в окружающую среду [10, 39].

Комплекс вирусных белков B5 и A34 играет важную роль в связывании EEV с поверхностью клеток. При этом участок в положении 80–130 белка A34 является областью взаимодействия этих белков [38]. Возможно, мутация Asp110 → Asn в гликопротеине A34 штамма INH-J снижает эффективность образования комплекса белков A34 и B5 и приводит к уменьшению эффективности связывания CEV с поверхностью клетки и дополнительному увеличению выхода EEV.

Нами впервые изучено, как увеличение продукции EEV-формы VACV может влиять на вирулентные и иммуногенные свойства вируса в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей.

Исследования проводили на штамме LIVP VACV, принятом в России для противооспенной вакцинации

[2]. В качестве исходного штамма использовали ранее описанный клоновый вариант LIVP [15]. В состав гена A34R ввели две точечные мутации, характерные для этого гена штамма INH-J VACV. На культуре клеток CV-1 показано, что созданный мутантный вариант LIVP-A34R продуцирует достоверно большее количество EEV-формы вирусных частиц по сравнению с родительским штаммом LIVP (рис. 1).

Патогенное воздействие обоих штаммов VACV показано при и/н заражении мышей линии BALB/c, что выявлялось по клиническим признакам и снижению массы тела мышей (рис. 2). Пик инфекции приходился на 6–8 сут после заражения. При этом мутантный штамм VACV LIVP-A34R проявлял (по этим признакам) несколько меньшую патогенность. В/к (рис. 3) или п/к введение вирусов даже в максимальной дозе  $10^8$  БОЕ не приводило к снижению массы тела мышей и появлению клинических признаков заболевания.

Анализ распространения вирусов в организме экспериментальных животных показал, что наибольшая диссеминация вирусов *in vivo* наблюдалась при и/н заражении, и уровень вирусной нагрузки во внутренних органах мышей зависел от дозы инфицирования (рис. 4). При этом следует отметить, что после заражения мышей в дозе  $10^7$  и  $10^6$  БОЕ на 7-е сут (пик инфекции) мутантный LIVP-A34R накапливался в легких в больших количествах по сравнению с исходным штаммом LIVP.

Гистологические исследования органов мышей показали, что наиболее типичные патоморфологические манифестации инфекции локализовались в органах дыхания, преимущественно в легких. Патологические изменения легких при и/н заражении LIVP-A34R проявлялись раньше, чем при заражении LIVP, и были более выраженными за счет большего поражения сосудов микроциркуляторного русла. Вследствие этого отек, плазморрагия и геморрагия проявлялись на 3-и сут в большей степени (рис. 5). На 10-е сут в обоих случаях патологические проявления снижались.

В печени мышей на 7-е сут эксперимента при и/н заражении выявлен только штамм LIVP-A34R (рис. 4). Все это указывает на более эффективное распространение LIVP-A34R в организме мышей по сравнению с LIVP. Однако в головном мозге штамм LIVP-A34R накапливался в меньшем количестве, чем LIVP.

Интрацеребральное заражение новорожденных мышей также показало, что штамм LIVP-A34R характеризуется сниженной нейровирулентностью по сравнению с родительским LIVP (рис. 6).

При в/к заражении вирусы обнаружили только в образцах кожи из места инъекции вирусных пре-

паратив, а также при максимальной инфицирующей дозе – у некоторых животных в легких и печени на 3 и 7 сут эксперимента. При этом в легких мутантный вариант L1VP-A34R встречался в больших количествах по сравнению с исходным штаммом L1VP. В образцах головного мозга, селезенки и почек вирусы не выявлены.

У животных, зараженных п/к исследуемыми вариантами VACV, вирусы выявлены только в образцах кожного лоскута из места введения в максимальной заражающей дозе. В образцах внутренних органов вирусы не обнаружены.

Известно, что уровень антительного ответа на вакцинацию против ортопоксвирусных инфекций играет решающую роль в защите от последующей вирусной инфекции [6]. Поэтому мы ограничились изучением индукции биосинтеза противовирусных антител в зависимости от дозы и способа введения вариантов VACV лабораторным мышам. Уровень противовирусных антител в сыворотках крови мышей, инфицированных изучаемыми штаммами вирусов, определяли двумя методами. Иммуоферментным анализом тестировали антитела, специфически взаимодействующие с вирионными белками IMV VACV. Вторым методом в тех же сыворотках крови определяли уровни антител, которые связывались *in vitro* с IMV и подавляли таким образом их инфекционность (бляшкообразование) при последующем заражении культуры клеток. Коррелирующие между собой результаты получены при в/к введении вирусов (рис. 7 и 8). Оба вируса индуцировали при этом высокие уровни продукции как VACV-специфичных, так и VACV-нейтрализующих антител, но L1VP-A34R обеспечивал больший иммунный ответ.

Наименьшую индукцию противовирусных антител наблюдали при п/к введении как L1VP, так и L1VP-A34R.

Максимальная продукция как VACV-специфичных, так и вируснейтрализующих антител выявлена при и/н заражении штаммом L1VP (рис. 7, 8). При данном способе введения мутантный вирус L1VP-A34R вызывал образование VACV-специфичных антител в такой же высокой концентрации, как родительский штамм L1VP, но меньший уровень VACV-нейтрализующих антител.

Таким образом, при и/н заражении оба вируса проявляют выраженную патогенность, распространяются по внутренним органам и, как результат, обеспечивают высокий уровень индукции противо-

вирусных антител. При этом патогенность и нейровирулентность штамма L1VP-A34R ниже, чем у L1VP. Однако такой способ введения вирусов, учитывая высокую общую вирулентность инфекции, мало приемлем при использовании VACV L1VP или L1VP-A34R в качестве живой противооспенной вакцины или основы для рекомбинантной поливалентной вакцины.

При п/к инъекции как L1VP, так и L1VP-A34R наряду с низкой вирулентностью продуцируют в организме мышей и низкий уровень вирусспецифичных антител.

Оптимальным способом введения как штамма L1VP, так и мутантного L1VP-A34R, определенным по соотношению патогенность/иммуногенность, можно считать внутрикожную инъекцию. Кроме кожи в месте введения, вирусы после в/к инъекции обнаруживаются титрованием (уровень выявления – не менее  $10^2$  БОЕ/г органа) на 3-и и 7-е сут эксперимента только в легких и печени некоторых животных и лишь при наибольшей использованной дозе заражения ( $10^8$  БОЕ). При этом L1VP-A34R накапливался в легких в больших количествах по сравнению с L1VP. Возможно, именно увеличенная способность к диссеминации в организме и обуславливает при в/к введении большую иммуногенность штамма L1VP-A34R по сравнению с исходным вариантом L1VP.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы показали, что за счет введения двух точечных замен в последовательность вирусного белка A34 штамм L1VP-A34R VACV продуцирует внеклеточную форму вирионов EEV в большем количестве по сравнению с исходным штаммом L1VP, проявляет меньшую нейровирулентность и при внутрикожном введении индуцирует повышенную продукцию противовирусных антител. Такой вариант VACV может стать основой для получения аттенуированной и высокоиммуногенной вакцины против оспы и других возрождающихся ортопоксвирусных инфекций человека. В качестве молекулярного вектора этот вариант VACV может использоваться для конструирования живых рекомбинантных поливалентных вакцин против различных инфекционных заболеваний и онколитических вариантов VACV. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда  
(грант № 19-14-00006).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F, Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health

Organization, 1988. 1460 p.  
2. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. Berlin, Heidelberg,

- New York: Springer, 2005. 425 p.
3. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26.
  4. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. P. 4–12.
  5. Payne L.G. // *J. Gen. Virol.* 1980. V. 50. P. 89–100.
  6. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. № 1. P. 33–41.
  7. Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 2915–2931.
  8. Locker J.K., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R., Griffiths G. // *Mol. Biol. Cell.* 2000. V. 11. P. 2497–2511.
  9. Kirn D.H., Wang Y., Liang W., Contag C.H., Thorne S.H. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 2071–2075.
  10. Blasco R., Sisler J.R., Moss B. // *J. Virol.* 1993. V. 67. P. 3319–3325.
  11. Thirunavukarasu P., Sathaiyah M., Gorry M.C., O'Malley M.E., Ravindranathan R., Austin F., Thorne S.H., Guo Z.S., Bartlett D.I. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. P. 1024–1033.
  12. Olson V.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses.* 2017. V. 9. e242.
  13. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 1726–1803.
  14. Prow N.A., Jimenez Martinez R., Hayball J.D., Howley P.M., Suhrbier A. // *Exp. Rev. Vaccines.* 2018. V. 17. P. 925–934.
  15. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.
  16. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. // *Инфекция и иммунитет.* 2020. Т. 10. doi:10.15789/2220-7619-PAI-1375.
  17. Бауэр Т.В., Трегубчик Т.В., Щелкунов С.Н., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. // *Медицинская иммунология.* 2020. Т. 22. С. 371–378.
  18. National Research Council Guidelines on Laboratory Animal Care and Use, 8th ed. National research Council of the National Academies. Washington: The National Acad. Press, 2011. 135 p.
  19. Leparac-Goffart I., Poirier B., Garin D. Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M. // *J. Clin. Virol.* 2005. V. 32. P. 47–52.
  20. McIntosh A.A.G., Smith G.L. // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 272–281.
  21. Paran N., Lustig S., Zvi A., Erez N., Israely T., Melamed S., Politi B., Ben-Nathan D., Schneider P., Lachmi B., et al. // *Virol. J.* 2013. V. 10. e229.
  22. Stabenow J., Buller R. M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 3909–3920.
  23. Shchelkunov S.N. // *PLoS Path.* 2013. V. 9. e1003756.
  24. Peres M.G., Bacchiega T.S., Appolinario C.M., Vicente A.F., Mioni M.S.R., Ribeiro B.L.D., Fonseca C.R.S., Pelicia V.C., Ferreira F., Oliveira G.P., et al. // *Viruses.* 2018. V. 10. e42.
  25. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. // *Вопр. вирусол.* 2019. Т. 64. С. 206–214.
  26. Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2019. V. 17. P. 129–139.
  27. Styczynski A., Burgado J., Walteros D., Usme-Ciro J., Laiton K., Farias A.P., Nakazawa Y., Chapman C., Davidson W., Mauldin M., et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2019. V. 25. P. 2169–2176.
  28. Shchelkunov S.N. // *Vaccine.* 2011. V. 29S. P. D49–D53.
  29. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
  30. Di Pilato M., Mejias-Perez E., Sorzano C.O.S., Esteban M. // *J. Virol.* 2017. V. 91. e00575–17.
  31. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses.* 2018. V. 10. e101.
  32. McClain D.J., Harrison S., Yeager C.L., Cruz J., Ennis F.A., Gibbs P., Wright M.S., Summers P.L., Arthur J.D., Graham J.A. // *J. Infect. Dis.* 1997. V. 175. P. 756–763.
  33. Phelps A., Gates A.J., Eastaugh L., Hillier M., Ulaeto D.O. // *Vaccine.* 2017. V. 35. P. 3889–3896.
  34. Roy S., Jaeson M.I., Li Z., Mahboob S., Jackson R.J., Grubor-Bauk B., Wijesundara D.K., Gowans E.J., Ranasinghe C. // *Vaccine.* 2019. V. 37. P. 1266–1276.
  35. Xie L., Zai J., Yi K., Li Y. // *Vaccine.* 2019. V. 37. P. 3335–3342.
  36. McIntosh A.A.G., Smith G.L. // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 272–281.
  37. McNulty S., Powell K., Erneux C., Kalman D. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 7402–7410.
  38. Monticelli S.R., Earley A.K., Tate J., Ward B.M. // *J. Virol.* 2019. V. 93. e01343–18.
  39. Earley A.E., Chan W.M., Ward B.M. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2161–2169.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru):

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)).

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком \*.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{пл}$  – температура плавления,  $T_{ф.п}$  – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0,25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК·РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

*Для книг:* фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

*Для периодических изданий:* фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

**Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.**