

Acta Naturae

CAACATACACTACTCCGGATGTACCCAACAGATACCA
 GATAAGAATAAGATTGTTATATGATCCTCGAGAATGGA
 AAAAACCCCAATTGACGACGGTGAACCCACTGGTAGA
 СТАААСАТССГТСС **ИНСТИТУТ** САСААТТССТТГСТТ
 ААГАССТСАСССА **БИОЛОГИИ** ССССАСГТТСААА
 ГСТСГГАГССГСА **ГЕНА** СГАГТ (АСАААААГТАТСГА
 ТТТСААТАААСААА **СТГАГТСГАГТА** ААГАГСАСТТГТ
 АТССААГАГСАААТ **СГТСАТТАГС** ССААГАГАААСГС
 АААГСТТТТТСТТТТАСГАТСАГААТССТАААГТСТА
 ААГТССАТАТГТГАСАТАТССАТАААГТСССТААГАСТТ
 ААГСАТАТГССТАСАТАСТААТАСАСТТАСААСАСАТА
 САССССААТАСААСАТАСАСТАСТТССГГАТГТАСССА
 АСАГАТАСССАГАТААГААТААГАТТГТТАТАТАГТАССТ
 СГАГААТГГААААААССССААТТСТАГАТАААГТСАСС
 САСТГГАТАГАСТАААСАТАССГСГТСССААТТТААСАГ
 ССТСАССССАТСГТСАСАТТСССАСГТТСАААГСТСГ
 ГАГССГСААТССССГАААААСАААААГТАТСГАТТТСАА
 ТАААСАААТТАТААГА **30 лет** ТСТААГАГСАСТТГА
 ТССААГАГСАААТГСАСТТГААТССААГАГАААСГС
 АААГСТТТТТСТТТТАСГАТСАГААТССТАААГТСТА

**СТСР КАК ПРИМЕР ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ
 ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ,
 СОДЕРЖАЩИХ КЛАСТЕРЫ ЦИНКОВЫХ
 ПАЛЬЦЕВ С2Н2-ТИПА
 СТР. 31**

**МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
 БЕЛКА PGLYRP1/Tag7
 ВО ВРОЖДЕННОМ
 И ПРИОБРЕТЕННОМ ИММУНИТЕТЕ
 СТР. 91**

Acta Naturae

ТОМ 13, № 1 (48), ЯНВАРЬ—МАРТ 2021
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. Габибов, 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. Исагулянц (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

Корректурa: 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, 2021

Номер подписан в печать 29 марта 2021 г.

Тираж 100 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

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

ОБЗОРЫ

- А. В. Брутер, М. Д. Родионова,
Е. А. Варламова, А. А. Штиль
Суперэнхансеры в регуляции транскрипции
генов: общебиологические аспекты
и мишени противоопухолевой терапии 4
- М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева
Модификаторы хроматина в регуляции
транскрипции: свежие находки
и перспективы 16
- О. Г. Максименко, Д. В. Фурсенко,
Е. В. Белова, П. Г. Георгиев
СТСФ как пример ДНК-связывающих
транскрипционных факторов, содержащих
кластеры цинковых пальцев C2H2-типа 31
- В. В. Скопенкова, Т. В. Егорова,
М. В. Бардина
Мышечно-специфические промоторы
для генной терапии 47

СОДЕРЖАНИЕ

Д. А. Сутормин, А. Х. Галивонджян,
А. В. Полховский, С. О. Камалян,
К. В. Северинов, С. А. Дубилей
**Разнообразие и функции
топоизомераз типа II** 59

М. А. Ястребова, А. И. Хамидуллина,
В. В. Татарский, А. М. Щербаков
**Белки семейства Snail: роль
в канцерогенезе и перспективы
противоопухолевой терапии** 76

Д. В. Яшин, Л. П. Сащенко, Г. П. Георгиев
**Механизмы функционирования
белка PGLYRP1/Tag7 во врожденном
и приобретенном иммунитете** 91

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Т. В. Бобик, Н. Н. Костин, Г. А. Скрыбин,
П. Н. Цабай, М. А. Симонова, В. Д. Кнорре,
О. Н. Стратиенко, Н. Л. Алешенко,
И. И. Воробьев, Е. Н. Хурс,
Ю. А. Мокрушина, И. В. Смирнов,
А. И. Алехин, А. Э. Никитин, А. Г. Габибов
**COVID-19 в России: клинические
и иммунологические особенности
пациентов первой волны** 102

А. А. Калинина, Л. М. Хромых,
Д. Б. Казанский, А. В. Дейкин, Ю. Ю. Силаева
**Адоптивный перенос сингенных
спленоцитов подавляет иммунный ответ
сублетально облученных мышей** 116

А. Э. Мамедов, И. Н. Филимонова,
И. В. Смирнов, А. А. Белогулов
**Особенности презентации
энцефалитогенного пептида MBP
комплексами HLA-DR, обуславливающими
протективность и предрасположенность
к рассеянному склерозу** 127

М. Ю. Мышкин, А. С. Парамонов,
Д. С. Кульбацкий, Е. А. Суркова,
А. А. Беркут, А. А. Василевский,
Е. Н. Люкманова, М. П. Кирпичников,
З. О. Шенкарев
**Потенциалчувствительный домен
из третьего повтора канала скелетных
мышц человека Na_v1.4 – новая мишень
действия «вольт-сенсорных» токсинов
из ядов пауков** 134

А. Ю. Скопин, А. Д. Григорьев,
Л. Н. Глушанкова, А. В. Шальгин, Г. Ванг,
В. Г. Карцев, Е. В. Казначеева
**Новый модулятор активности
STIM2-зависимых депо-управляемых
кальциевых каналов** 140

Правила для авторов 147

GTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTTAAGCATATGC
CTACATACTAATACTTACAACACATACACCCCAATA
CAACATACTACTCCGGATGTACCCAACAGATACCA
GATAAGAATAAGATTGTTATATGATCCTCGAGAATGGA
AAAAACCCCAATTACGACGGTGAACCCACTGGTAGA
CTAAACATCCGTCGИНСТИТУТСААТTCCTTGCTT
AAGACCTCACCCАБИОЛОГИИСТCCCACGTTCAAA
GCTCGGAGCCGCAГЕНАССGAGTACAAAAGTATCGA
TTTCAATAAAACAAАСТGAGTCCGAGTAAGAGCACTTGT
ATCCAAGAGCAAAАCGTCATTAGCCCAAGAGAAACGC
AAAGCTTTTTCTCTTTACGATCAGAATCCTAAAGTCTA
AAGTCCATATGTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTT
AAGCATATGCCTACATACTAATACTTACAACACATA
CACCCCAATACAACATACACTACTCCGGATGTACCCA
ACAGATACCAGATAAGAATAAGATTGTTATATGATCCT
CGAGAATGGAAAAACCCCAATTCTAGATAAGTCACC
CACTGGTAGACTAAACATCCGCGTCCCAATTTAACAG
CCTCACCCCATCGTCACATTTCCACGTTCAAAGCTCG
GAGCCGCAATCCCGAAAAACAAAAGTATCGATTTCAA
TAAACAAATTATAAGA 30 лет TCTAAGAGCACTTGA
TCCAAGAGCAAATGCACTTGAATCCAAGAGAAACGC
AAAGCTTTTTCTCTTTACGATCAGAATCCTAAAGTCTA
AAGTCCATATGTGACATATCCATAAGTCCCTAAGACTT

УДК 577.214

Суперэнхансеры в регуляции транскрипции генов: общебиологические аспекты и мишени противоопухолевой терапии

А. В. Брутер^{1,2*}, М. Д. Родионова³, Е. А. Варламова^{1,2}, А. А. Штиль^{1,2}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия³Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

*E-mail: aleabruter@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2020

Принята к печати 07.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11067

РЕФЕРАТ Суперэнхансеры – элементы генома, активирующие транскрипцию генов, – представляют собой участки ДНК с повышенной концентрацией транскрипционных комплексов. В таких мультибелковых структурах особая роль принадлежит транскрипционным протеинкиназам, главным образом, циклинзависимым киназам 8 и 19. Эти уникальные белки рассматриваются как новые мишени противоопухолевых соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транскрипция, суперэнхансеры, транскрипционные протеинкиназы, мишень-направленная терапия, опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

Матричный синтез молекул, в частности, транскрипция генов – важнейший процесс в живой природе. Этот эволюционно консервативный механизм встречается во всех без исключения организмах – от вирусов до высших млекопитающих. Его биологическая роль – передача и закрепление в потомстве генетической информации от макромолекулы-матрицы. Краеугольное значение транскрипции не ограничено «нормальными» процессами – онто- и филогенезом, видообразованием, обеспечением биологического многообразия, контролем наследственности и др. Углубление представлений о молекулярных механизмах транскрипции позволяет раскрыть ее фундаментальное значение для патологических процессов. Сегодня невозможно интерпретировать этиологию и патогенез заболеваний без анализа регуляции экспрессии генов в патологическом очаге. Правоммерно утверждать, что именно дифференциальная экспрессия генов – изменения набора функционирующих генов, активности (интенсивности) и временной регуляции экспрессии по сравнению с физиологической ситуацией – определяет сущность болезни как «транскрипционный дисбаланс».

На этой основе формируется современный подход к терапии – мишень-направленное (таргетное)

воздействие на конкретные механизмы транскрипции. Эти механизмы в клетках млекопитающих необычайно многообразны, взаимозаменяемы и недостаточно изучены; к тому же ряд этих механизмов не поддается фармакологической регуляции (undruggable targets). Поэтому таргетная «транскрипционная терапия» делает лишь первые шаги.

На какие структурно-функциональные элементы транскрипционного аппарата можно воздействовать для регуляции генной экспрессии? Какие именно механизмы регулировать и как эта проблема решается в аспекте пространственной организации транскрипции? Требуются исследования регуляторных областей генов – промоторов и энхансеров: их функции состоят в обеспечении правильной локализации мультибелковых транскрипционных комплексов, старта транскрипции и регуляции ее скорости. Поскольку протеинкиназы – едва ли не наиболее распространенные мишени в современном дизайне лекарств, не случайно среди разнообразия механизмов регуляции экспрессии генов транскрипционные киназы – отдельный класс серин-треониновых фосфотрансфераз – становятся объектом исследования как возможные мишени лекарственных воздействий.

В настоящем обзоре анализируются элементы генома, в которых особенно велико присутствие

транскрипционных «машин»: суперэнхансеры и ассоциированные с ними белки – транскрипционные факторы, кофакторы и протеинкиназы. Мы рассматриваем эти элементы как структурно-функциональные единицы транскрипционного аппарата и терапевтические мишени в опухолевых клетках.

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ: ОСОБЕННЫЕ ЭНХАНСЕРЫ!

Определение понятия

Концепция суперэнхансеров впервые сформулирована при изучении регуляции экспрессии генов в эмбриональных стволовых клетках. Whyte и соавт. [1] обнаружили особенности регуляторных областей генов, активная экспрессия которых связана с поддержанием недифференцированного плюрипотентного состояния (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Esrrb*, микроРНК miR-290-295 и т.д.). Эти участки генома отличались от обычных энхансеров по протяженности и расстоянию от регулируемого гена, а также по количеству и набору связанных с ними транскрипционных факторов. Среди транскрипционных факторов преобладали *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и *Esrrb* (присутствие двух последних в обычных энхансерах особенно отличается от присутствия в суперэнхансерах) – ключевые транскрипционные факторы, поддерживающие и даже способные индуцировать плюрипотентное состояние эмбриональных клеток, а также *Med1* – компонент комплекса Mediator. Выявленные области были названы суперэнхансерами. Уже в первом исследовании обнаружили важную особенность суперэнхансеров – при изменении уровня транскрипционных факторов в клетке, например, при частичном снижении количества *Oct4* или комплекса Mediator транскрипция соответствующих генов прекращалась, в то время как транскрипция генов, регулируемых обычными энхансерами, изменялась незначительно [1].

Попытка дать обобщенное определение понятию «суперэнхансер» приводит к необходимости провести границу между этими участками генома и обычными энхансерами. Эта граница оказывается условной (см. ниже). Определение суперэнхансеров носит эмпирический характер и опирается на два критерия. К суперэнхансерам относят участки генома со следующими особенностями: 1) участки, содержащие протяженные (до 12.5 т.п.н.) группы энхансеров, 2) участки с аномально высоким связыванием определенного набора транскрипционных факторов (как правило, транскрипционные факторы, существенные для физиологии клеток данного типа: *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* в эмбриональных стволовых клетках, *MyoD* – важнейший тканеспецифичный транскрипционный фактор в мышечных клетках [2] и т.д.)

и кофакторов. На практике эти два структурных критерия коррелируют с двумя функциональными критериями: высоким уровнем экспрессии регулируемых суперэнхансерами генов и резким изменением уровня экспрессии в ответ на небольшие изменения концентрации транскрипционных факторов [1, 3].

Хотя несколько тысяч энхансеров регулируют экспрессию тысяч генов, лишь несколько сотен суперэнхансеров регулируют экспрессию генов, продукты которых особенно важны для клеток данного типа [1, 4–6]. Кроме того, некоторые суперэнхансеры функционируют по механизму положительной обратной связи: суперэнхансерами регулируется экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы, активирующие гены, регулируемые суперэнхансерами. К таким генам относятся *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Esrrb*, *Prdm14* [6].

Примечательно, что в ходе эволюции суперэнхансерами «обзавелись» многие гены, играющие ключевую роль в биологии клетки, но не так называемые гены «домашнего хозяйства», характеризующиеся только стабильно высоким уровнем экспрессии. Суперэнхансеры чаще обычных энхансеров оказываются финальной мишенью основных сигнальных каскадов. Кроме повышенного связывания с транскрипционными факторами (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и т.д.), регулирующими поддержание недифференцированного состояния эмбриональных стволовых клеток, обнаружено повышенное связывание суперэнхансеров с транскрипционными факторами, замыкающими важные сигнальные каскады: TCF3 (каскад WNT), SMAD3 (каскад TGF- β), STAT1 (JAK-STAT) и STAT3 (LIF) [7, 8].

Идентификация суперэнхансеров в геноме

Наиболее распространенный метод идентификации активных суперэнхансеров основан на характерном эпигенетическом состоянии, присущем активным энхансерам: монометилировании вместо триметилирования лизина в положении 4 гистона 3 (H3K4me1; позволяет отграничить энхансеры от активных промоторов) и ацетилировании лизина в положении 27 гистона 3 (H3K27ac; «маркирует» активные энхансеры в отличие от неактивных регуляторных элементов) [1, 3, 9]. На первом, экспериментальном, этапе проводят иммуопреципитацию H3K27ac участков хроматина с последующим секвенированием связанных с ними фрагментов ДНК. Полученные данные обрабатывают биоинформатическими методами (см. [1, 4]). Обнаруженные при секвенировании последовательности ДНК сравнивают с соответствующим геномом и выявляют многократно обнаруженные участки (так называемые пики). Пики, отстоящие друг от друга менее чем на 12.5 т.п.н., объединяют

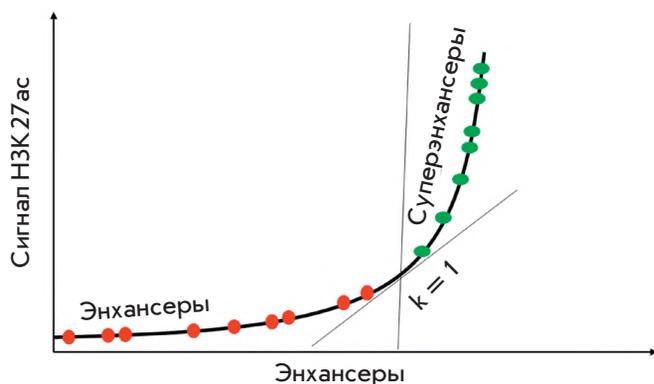


Рис. 1. Схема разделения регуляторных элементов на обычные энхансеры и суперэнхансеры. Показано распределение энхансеров по количеству связанных с ними молекул H3K27ac. Адаптировано из [3, 10]

в единые протяженные энхансеры. Затем нормируют плотность H3K27ac в обогащенных местах на среднюю плотность H3K27ac для данного участка генома и располагают энхансеры по возрастанию обогащения. Полученная кривая характеризуется резким ростом в области высокого обогащения гистонами 3 с ацетилированным лизином-27. Содержащиеся в этой области энхансеры и относят к суперэнхансерам; критерий — нахождение энхансера на графике (рис. 1) справа от точки, в которой производная кривой обогащения равна 1 [10].

Наряду с обогащением гистоновыми «метками», для выявления суперэнхансеров могут использоваться и другие молекулярные критерии активной транскрипции: чувствительность к DNKазе I, увеличенное связывание транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, Nanog и др.), присутствие активаторов Med1 и p300 [1, 3, 6]. В базе данных SEdb [11] представлено более 300 000 суперэнхансеров из 542 образцов, полученных из линий клеток человека. Указаны различия в количестве суперэнхансеров между отдельными линиями неопухолевых и опухолевых клеток. Эта база данных позволяет детально анализировать нуклеотидные последовательности суперэнхансеров, выявлять сайты связывания транскрипционных факторов, полиморфизм и др.

Определенные тем или иным методом суперэнхансеры часто состоят всего из нескольких одиночных энхансеров, а около 15% суперэнхансеров — только из одного [12]. Столь нечеткое эмпирическое определение, основанное к тому же на условном выборе границы между обычными энхансерами и суперэнхансерами, позволяет поставить вопрос: действительно ли суперэнхансеры — отдельный класс регуляторных элементов или это особенно эффективная разновидность энхансеров?

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СУПЕРЭНХАНСЕРОВ

Различие между обычными энхансерами и суперэнхансерами ярко проявляется в характере зависимости активности транскрипции, обеспечиваемой регуляторным элементом и количеством связанных с ним транскрипционных факторов и кофакторов. У обычных энхансеров эта зависимость линейная, а для суперэнхансеров она имеет вид «все или ничего» [1, 13], напоминающий зависимости, описывающие фазовые переходы в рамках статистической термодинамики. На практике это выражается в высокой чувствительности суперэнхансеров к изменениям условий. Делеция небольшого участка или снижение концентрации одного из кофакторов (BRD4, CDK7) может полностью инактивировать суперэнхансер [4, 6, 14, 15]. Подробный анализ этих механизмов приведен ниже.

Для объяснения закономерностей функционирования суперэнхансеров предложена модель фазовой сепарации [13]. Высокая концентрация интенсивно взаимодействующих молекул приводит к формированию своего рода безмембранной органеллы, фазово отделенной от остального содержимого ядра. Модель учитывает два численных показателя: количество молекул в заданном объеме (ДНК, гистоны, транскрипционные факторы и кофакторы) (принято, что в среднем оно равно 10 для обычного энхансера и 50 для суперэнхансера) и «валентность» этих молекул — число, описывающее количество взаимодействий, доступных молекуле. Транскрипционная активность в этой модели определяется по доле молекул, взаимодействующих между собой в данный момент (рис. 2, 3). Состояние фазовой сепарации наступает, когда взаимодействуют почти все молекулы, т.е. доля взаимодействующих молекул приближается к 1. Транскрипционная активность при этом увеличивается до максимума. Валентность молекул в системе может расти, например, при ремоделировании и активации хроматина в районе энхансера или суперэнхансера. Математическое моделирование показало, что транскрипционная активность обычного энхансера зависит от валентности системы линейно, а в случае суперэнхансера при относительно небольших значениях валентности происходят фазовая сепарация и резкое увеличение транскрипционной активности практически до максимума.

Согласно этой модели, при ингибировании кофактора или делеции сайта связывания валентность снижается. В случае суперэнхансера это приводит к резкому падению транскрипционной активности от максимального значения до минимального.

Кроме молекул ДНК и белков, в состав комплекса входят и энхансерные РНК (эРНК) — некодирующие РНК, транскрибирующиеся с энхансеров.

Среди них присутствуют короткоживущие короткие РНК без поли(А)-участков, способные транскрибироваться в обоих направлениях, и более длинные с поли(А)-участками (транскрибируются только в 5'→3'-направлении). эРНК участвуют в организации взаимодействия промоторов с энхансерами: увеличивают прочность связывания транскрипци-

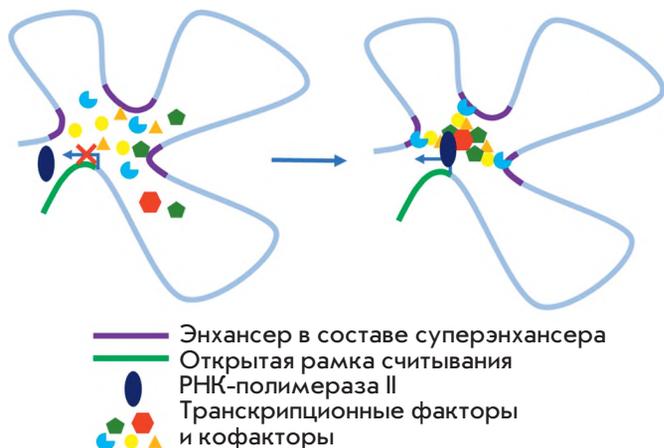


Рис. 2. Суперэнхансеры в модели фазовой сепарации. Транскрипционные факторы и коактиваторы взаимодействуют с разными участками суперэнхансера и друг с другом. Высокая интенсивность их взаимодействия приводит к фазовой сепарации ДНК-белкового транскрипционного комплекса и резкому росту активности транскрипции. Слева отражена ситуация до начала взаимодействия и сепарации. Синтез мРНК РНК-полимеразой II не происходит. Справа – ситуация после сепарации и активации транскрипции. Адаптировано из [13]

онных факторов с ДНК, привлекают и активируют кофакторы, сокращают транскрипционную паузу. Суперэнхансеры экспрессируют эРНК на более высоком уровне, чем обычные энхансеры; кроме того, эРНК чаще экспрессируются с суперэнхансеров, чем с обычных энхансеров [10]. эРНК могут участвовать в активации экспрессии соответствующего гена, но могут активировать и другие гены, в том числе расположенные на других хромосомах, распространяя таким образом действие энхансера (дистантная регуляция генома) [16].

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ В РЕГУЛЯЦИИ НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Суперэнхансеры значительно чаще, чем обычные энхансеры, оказываются регуляторами ключевых процессов в нормальных клетках и при патологических процессах [6]. Суперэнхансер *IgH 3'RR*, расположенный в 3'-регуляторной области локуса *IgH* на 14-й хромосоме в геноме человека, регулирует рекомбинацию в В-клетках, в частности, VDJ-рекомбинацию в В1-клетках [17] и переключение изотипа в зависимости от внешнего сигнала в В2-клетках [18]. Другой элемент, важный для этого процесса – суперэнхансер локуса *Aicda*. Ферменты семейства ТЕТ, обеспечивающие деметилирование этого суперэнхансера, необходимы для переключения изотипа [19]. Конверсия адипоцитов из бурого жира в белый сопровождается активацией суперэнхансера, связанного с геном ядерного рецептора PPAR γ [20]. Также за счет активации суперэнхансера происходит индукция синтеза ренина клетками почек, в обычных условиях не синтезирующими ренин. Активация

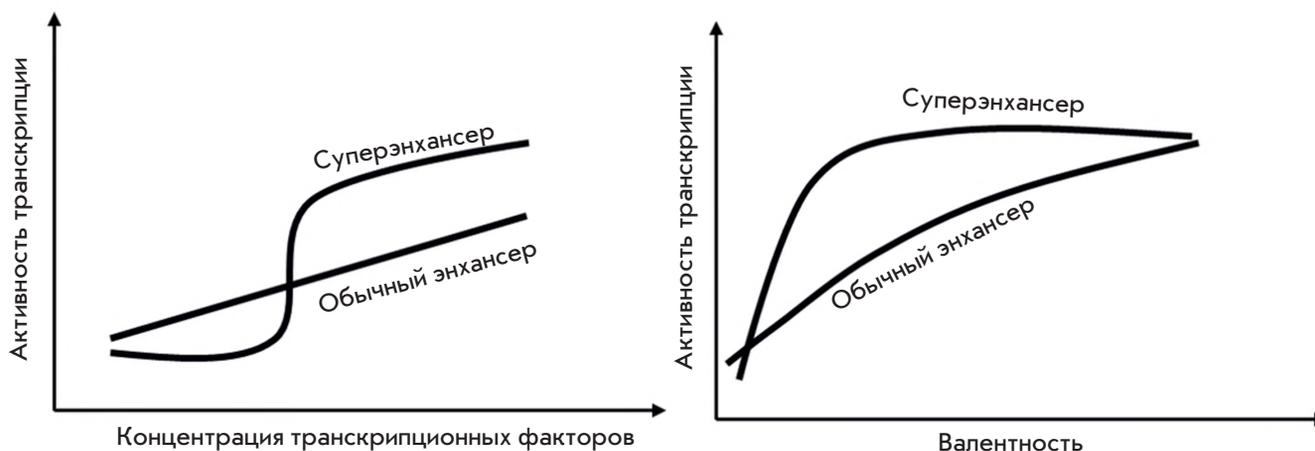


Рис. 3. А – обобщенная зависимость активности транскрипции, регулируемой энхансером и суперэнхансером, от концентрации транскрипционных факторов. Б – зависимость активности экспрессии энхансера и суперэнхансера от валентности – количества доступных межмолекулярных взаимодействий в рамках теории фазовой сепарации. Обычный энхансер моделирован системой, состоящей из 10 молекул, а суперэнхансер – из 50. Адаптировано из [13]

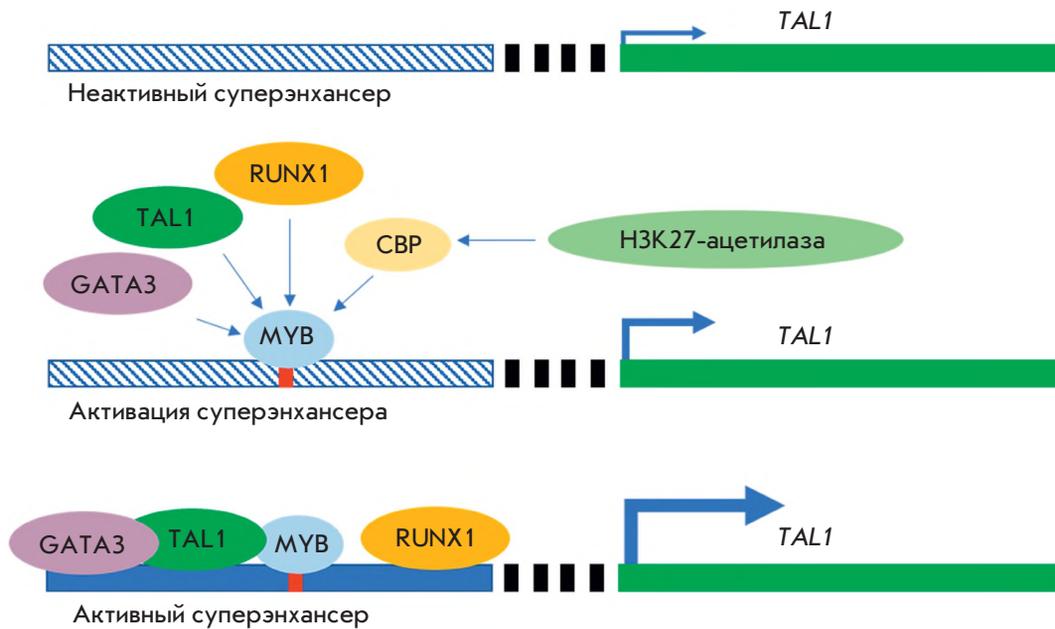


Рис. 4. Инсерция сайта связывания транскрипционного фактора Муб активирует суперэнхансер, регулирующий экспрессию онкогена *TAL1*. Связанный с ДНК Муб привлекает белок CBP (cyclic AMP response element binding protein) и его партнера – гистонацетилазу H3K27, активирующих хроматин в районе суперэнхансера, а также дополнительные транскрипционные факторы

суперэнхансера происходит только в потомках эмбриональных ренинпродуцирующих клеток [21]. Регулируемая суперэнхансером циркРНК (circNfix), специфичная для зрелых кардиомиоцитов [22], не позволяет делиться зрелым кардиомиоцитам, а ее подавление улучшает регенерацию тканей после экспериментального инфаркта миокарда у мышей.

Точечные мутации в некодирующих областях генома составляют около 90% от всех мутаций, связанных с болезнями (согласно GWAS, genome wide association studies). Такие мутации чаще встречаются в суперэнхансерах, чем в обычных энхансерах. Этот вывод подтвержден и при сравнении суперэнхансеров в разных типах клеток одного пациента: в патологическом очаге и вне его. Мутации (single nucleotide polymorphism, SNP) в суперэнхансерах связаны с болезнью Альцгеймера, системной красной волчанкой, сахарным диабетом типа 1 и др. Так, несколько SNP обнаружены в суперэнхансере гена *BIN1*, повышенная экспрессия которого связана с риском развития болезни Альцгеймера. В случае диабета типа 1 повышенное содержание мутаций обнаружено в суперэнхансерах Т-хелперов. Полиморфизмы, связанные с системной красной волчанкой, оказались сконцентрированы в суперэнхансерах генов, ключевых для В-клеток [6].

Суперэнхансеры также могут эпигенетически активироваться в ответ на внешние стимулы. Например, при воспалении активация транскрипционного фактора NF-κB в эндотелиальных клетках может приводить к формированию активных суперэнхансеров и поддержанию высокой экспрес-

сии генов, продукты которых способствуют адгезии лейкоцитов (*SELE*, *VCAM1*), а также хемокина *CCL2*. Активация суперэнхансеров происходила за счет связывания ацетилированной формы NF-κB с BRD4. При ингибировании BRD4 активации суперэнхансеров не наблюдалось [23].

Суперэнхансеры в опухолевых клетках

Высокий уровень экспрессии онкогенов в злокачественных клетках может быть обусловлен появлением нового суперэнхансера. Ускоренная пролиферация злокачественных клеток регулируется сигнальными каскадами. Интенсивность пролиферации клеток аденокарциномы толстой кишки (линия НСТ116) зависит от активации сигнального пути Wnt; в этой линии активирован суперэнхансер в локусе *c-MYC*. Наряду с этим обнаружено повышенное связывание с суперэнхансером транскрипционного фактора TCF4 – эффектора Wnt-каскада. Аналогичный механизм регуляции обнаружен в клетках эстрогензависимого рака молочной железы [7].

Возникновение суперэнхансеров в опухолевых клетках происходит по тем же механизмам, как и любые изменения экспрессии генов. В злокачественной трансформации клеток могут участвовать как генетические механизмы: хромосомные транслокации [6], амплификация [24–27], делеции, инсерции [28] и точечные мутации, так и эпигенетические – активация экспрессии онкогенов [4, 6, 11, 29–31] или снижение экспрессии антионкогенов [8, 31–33]. В первом варианте возможно возникновение новых и исчезновение ранее существовавших супер-

энхансеров, а также перемещение потенциальных онкогенов под контроль несвойственных им активных суперэнхансеров. Эпигенетическая регуляция представлена активацией или инактивацией соответствующих суперэнхансеров.

Локус *c-Myc* особенно часто приобретает суперэнхансеры в процессе канцерогенеза. В клетках множественной миеломы суперэнхансер, регулирующий экспрессию генов локуса *igH*, оказывается в локусе *c-Myc* путем транслокации [6]. У отдельных пациентов с острым Т-клеточным лейкозом обнаружены редупликации в некодирующей области, соответствующей суперэнхансеру, регулирующему ген *c-Myc*. Амплифицированный фрагмент обеспечивает Notch-зависимое функционирование суперэнхансера [25]. С амплифицированным участком оказались связаны белки комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин и важного для пролиферации опухолевых клеток [34]. Фокальные амплификации (копирование небольшого участка генома с последующим переносом копий в произвольные места генома) суперэнхансеров в 3'-регуляторную область гена *c-Myc* обнаружены в опухолях легкого и эндометрия [26]. Аналогичным образом фокальная амплификация суперэнхансера в 3'-регуляторную область гена *KLF4* и увеличение его экспрессии обнаружены при плоскоклеточном раке головы и шеи [27]. При Т-клеточных лейкозах небольшая (2–12 п.н.) инсерция, образующая сайт связывания транскрипционного фактора Myb, опосредует формирование активного суперэнхансера размером 8 т.п.н., привлекая дополнительные транскрипционные факторы [28] (рис. 4).

Важный генетический механизм злокачественной трансформации клеток представлен нарушением границ топологически ассоциированных доменов (ТАД) – участков хромосом длиной около 1 млн п.н., фактически изолированных друг от друга. Фрагменты одного ТАД взаимодействуют между собой гораздо чаще, чем фрагменты разных ТАД. Разделение на эти домены эволюционно консервативно и, вероятно, возникло для предотвращения взаимодействия далеко расположенных энхансеров и суперэнхансеров с «чужими» промоторами. Границы между ТАД представляют собой сайты связывания репрессора транскрипции CTCF (CCGCGNGGNGGCAG) и ассоциированные с ними белковые комплексы CTCF–когезин. Мутации в генах, кодирующих когезин и CTCF, и в сайтах их связывания с ДНК часто обнаруживаются в трансформированных клетках [9]. В линии клеток Jurkat (CD4⁺8⁺ тимоциты) на границах ТАД обнаружены небольшие делеции. Воспроизведя эти делеции в эпителиоцитах (линия HEK293) с помощью системы

CRISPR/Cas9, выявили зависимую от суперэнхансера активацию онкогенов *TAL1* и *LMO1* [35].

Изменения в нуклеотидных последовательностях суперэнхансеров могут не только влиять на их связывание с белками, но и приводить к изменениям в последовательностях и количестве молекул эРНК. Определенные эРНК, связанные с «онкогенными» суперэнхансерами, обладают онкогенными свойствами сами по себе. Эти эРНК принимают участие в регуляции ключевых процессов: пролиферации, апоптоза, аутофагии, эпителиально-мезенхимального перехода и ангиогенеза [16].

В эпигенетической регуляции активности суперэнхансеров большую роль играет белок BRD4 (от bromodomain), связывающийся с ацетилированными остатками лизина в гистонах (т.е. с активным хроматином). При исследовании диффузных крупноклеточных В-клеточных лимфом показано, что 1/3 молекул BRD4 в клетке сосредоточены в суперэнхансерах. Экспрессия соответствующих генов оказалась очень чувствительной к фармакологическому ингибированию BRD4 [14]. Низкомолекулярный ингибитор BRD4 – соединение JQ1 – вызывал снижение экспрессии суперэнхансер-зависимых генов, в частности, онкогена *c-Myc* в клетках миеломы [4]. Высокий уровень экспрессии *c-Myc* в клетках рака толстой кишки (линии HCT116 и DLD1) также поддерживается суперэнхансером. Нокдаун генов *BRD4*, *MED12* и *MED13/13L* снижал зависимую от суперэнхансеров экспрессию генов и ингибировал пролиферацию клеток колоректального рака [29].

Неожиданный вариант эпигенетической активации суперэнхансеров обнаружен при изучении инфекции В-клеток вирусом Эпштейна–Барр. В зараженных клетках этот вирус синтезирует собственные транскрипционные факторы EBNA2, 3A, 3C и EBNA-LP и активирует некоторые клеточные (RelA, RelB). Эти транскрипционные факторы формируют активные суперэнхансеры, регулирующие ключевые для выживания клеток гены *c-Myc*, *MIR155*, *IKZF3* и *Bcl-2*. Активация суперэнхансеров чувствительна к ингибированию BRD4 – ее отменяло соединение JQ1 [36].

Суперэнхансеры также регулируют статус дифференцировки опухолевых стволовых клеток, что может быть использовано в терапевтических стратегиях. Для поддержания плюрипотентного состояния стволовых клеток глиомы важен белок ELOVL2 (elongation of very long chain fatty acids protein 2), экспрессия которого в этих клетках особенно высока и запускается эпигенетической активацией соответствующего суперэнхансера. ELOVL2 играет ключевую роль в синтезе полиненасыщенных жирных кислот – компонентов плазматической

мембраны, а также участвует в передаче сигналов от рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Селективная инактивация суперэнхансера ELOVL2 методом dCas9-KRAB приводит к посттранскрипционному снижению уровня EGFR [30]. Потеря функциональной активности В-клеточным регулятором транскрипции Ikaros ассоциирована с негативным прогнозом при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе. Это объясняется тем, что Ikaros необходим для терминальной дифференцировки быстро пролиферирующих предшественников В-клеток. Интересна «двуликость» Ikaros: он поддерживает неактивное состояние хроматина в областях суперэнхансеров генов, экспрессия которых обуславливает недифференцированное состояние В-клеток, но также поддерживает и активный хроматин в суперэнхансерах генов, продукты которых важны для дифференцировки [31].

Приведенный пример иллюстрирует ситуацию, при которой злокачественный потенциал клетки обеспечивается не высокой экспрессией онкогенов, обусловленной суперэнхансерами, а инактивацией зависимой от суперэнхансеров экспрессии антионкогенов. В этой связи обоснованными представляются лечебные стратегии, направленные на реактивацию суперэнхансеров антионкогенов. Ниже проанализирована возможность реализации такой стратегии.

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ КАК СРЕДОТОЧИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ

Как указано выше, суперэнхансеры обуславливают возможность принципиальным образом изменять транскрипционную программу даже в ответ на относительно слабое воздействие. Злокачественная трансформация нередко связана с возникновением (формированием) или активацией имевшегося, но не функционировавшего, суперэнхансера. Поэтому суперэнхансеры и ассоциированные с ними белки приобретают интерес как мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Можно надеяться, что терапевтический эффект будет достигаться при относительно низких концентрациях таких препаратов (см. ниже).

В качестве терапевтических мишеней рассматривают два класса белков, связанных с суперэнхансерами: белки, имеющие бромодомен (в первую очередь, BRD4), и циклинзависимые протеинкиназы CDK4/6, CDK7, CDK8 и CDK12/13.

Белки, содержащие бромодомен

Белки, несущие консервативную лизинсвязывающую аминокислотную последовательность – бромодомен, обеспечивают функционирование суперэнхансеров, поддерживая активное состояние

хроматина благодаря взаимодействию с ацетилированными остатками лизина в белках хроматина. В результате этого взаимодействия к суперэнхансерам рекрутируются транскрипционные факторы и РНК-полимераза II. Ингибирование белков, несущих бромодомен, может приводить к инактивации хроматина.

Ингибиторы BRD4 – низкомолекулярные соединения JQ1 и I-BET151 – показали обнадеживающие результаты в доклинических моделях острого миелоидного лейкоза и множественной миеломы. Наблюдалось замедление роста опухолей, подавление экспрессии *Myc* и нижележащих транскрипционных программ [9]. Отдельные соединения, ингибирующие BRD2/3/4/T путем конкурентного связывания, проходят клинические испытания [37]. Тестирование ингибитора ABBV-075 (Mivebresib) проведено у 10 пациентов с устойчивыми к стандартной терапии и/или рецидивирующими формами острого миелоидного лейкоза, у одного из них достигнута полная ремиссия, количество бластных клеток в костном мозге у четверых сократилось минимум вдвое при хорошей переносимости лечения. Перспективным направлением является также комбинированная терапия [38].

Циклинзависимые протеинкиназы

Циклинзависимые киназы CDK4 и CDK6 играют ключевую роль в смене фаз клеточного цикла G1-S. Ингибиторы CDK4/6 палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб включены в протоколы лечения гормончувствительного HER2-негативного рака молочной железы в качестве препаратов для монотерапии. В составе комбинированной терапии ингибиторы CDK4/6 проходят клинические испытания и при других вариантах рака молочной железы [39]. Селективные ингибиторы CDK4/6 оказывают цитостатическое действие и вызывают гибель клеток саркомы Юинга в культуре и *in vivo*, а также снижают экспрессию ряда генов, зависимых от суперэнхансеров, в частности циклина D1 [40].

Особая группа циклинзависимых протеинкиназ не участвует в регуляции фаз клеточного цикла, а функционирует как структурно-функциональный компонент транскрипционного аппарата. К таким «транскрипционным» протеинкиназам относятся, в частности, CDK7, CDK8 и ее паралог CDK19 (CDK8/19), а также CDK9 и -12/13 [41]. CDK7 – компонент иницирующего транскрипцию комплекса TFIIH, опосредует фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II и старт транскрипции. CDK9 в составе комплекса p-TEFb также путем фосфорилирования С-концевого домена РНК-полимеразы II регулирует переход к элонгации [41].

Непосредственно элонгацию и процессинг мРНК активируют CDK12 и -13 [42].

THZ1, ингибитор CDK7 (и, в некоторой степени, CDK9 и CDK12) [43, 44], снижает транскрипцию в клетках разного тканевого происхождения; трансформированные клетки оказались чувствительными к низким концентрациям THZ1. Это соединение подавляло ассоциированные с суперэнхансерами онкогены, в частности в локусе *c-Myc* [45]. В 2020 г. начаты клинические испытания более селективного ингибитора CDK7 – соединения SY5609 [46].

Под действием THZ531 – ингибитора CDK12 – снижается зависимость от суперэнхансеров экспрессия онкогенов *RUNX1*, *MYB*, *TAL1* и *GATA3* в клетках Jurkat [47]. Поскольку первые специфические ингибиторы CDK12 синтезированы недавно, их клинические испытания пока не начались. В культурах клеток и на моделях опухолей у мышей показано, что ингибирование CDK12 оказывает выраженный эффект при остеосаркоме, опухолях печени, молочной железы и яичников, а также нейробластоме [48].

Особенная роль в регуляции транскрипции принадлежит CDK8. Эта серин-треониновая протеинкиназа в кооперации с циклином C (CCNC), белками MED12 и MED13 формирует регуляторный CDK-модуль важнейшего транскрипционного комплекса – Mediator. Компоненты этого комплекса консервативны у всех эукариот. Важно, что CDK8/19, в отличие от других CDK, не регулируют смену фаз клеточного цикла [49]. Основной (не единственной) функцией CDK8/19 является регуляция фосфорилирования C-концевого домена РНК-полимеразы II по остаткам серина-2 и -5 гептапептидного повтора, составляющего указанный домен. Такое фосфорилирование показано в бесклеточной системе; в клетках это событие необходимо на разных этапах транскрипции – инициации, выхода из паузы, элонгации первичного транскрипта, однако роль CDK8/19 в указанном фосфорилировании нуждается в прямом экспериментальном доказательстве. В отличие от CDK7 и CDK9, функционирующих на всех промоторах, CDK8/19 участвует только в регуляции активности РНК-полимеразы II на активно транскрибируемых генах – индуцибельных, а также функционирующих в развитии организма [50–53]. Селективность активации экспрессии указывает на то, что CDK8/19 – один из ключевых механизмов транскрипционного перепрограммирования. Эта уникальная функция стала предметом детального исследования в последние годы.

Транскрипционное перепрограммирование не является жизненно важным для взрослого организма в гомеостатических условиях; длительное ингибирование CDK8/19 не имеет фенотипических проявлений.

Не имеет значительных проявлений и генетический (опосредованный системой Cre/Lox) нокаут гена *cdk8* у взрослых мышей [54]. Однако перепрограммирование транскрипции необходимо для развития организма: нокаут *cdk8* у мышей летален на стадии предимплантационного эмбриона [55], а нульмутации в генах, кодирующих белки *cdk8* или *ccnc* у *Drosophila melanogaster*, приводят к гибели на стадиях поздней личинки третьего возраста и предкуколки [56, 57].

Важно, что нокаут гена *CDK8* и фармакологическое ингибирование киназной активности по-разному влияют на общие паттерны экспрессии генов, что указывает на два принципиально разных механизма действия CDK8/19 – зависимого и независимого от киназной функции.

Существует ли связь между CDK8/19 и суперэнхансерами? В экспериментах по иммунопреципитации выявлено повышенное присутствие CDK8 в областях отдельных суперэнхансеров. По данным РНК-секвенирования, 2/3 генов, на экспрессию которых влияет ингибирование CDK8, – это гены, регулируемые суперэнхансерами. Среди суперэнхансеров, связь которых с CDK8 установлена в обеих упомянутых экспериментальных системах, оказались суперэнхансеры генов, кодирующих транскрипционные факторы *Nanog*, *Oct3/4* и *SOX2*, а также значительное число суперэнхансеров генов, регулируемых сигнальным каскадом Wnt [32].

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ И CDK8/19 – ОБЪЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Транскрипционное перепрограммирование принципиально важно для развития многих патологических процессов, особенно опухолевых. Дерегуляция CDK8/19 часто обнаруживается в опухолях, в которых CDK8 участвует в активации важных сигнальных путей, опосредованных Wnt/ β -катенином [58], NF- κ B [51], TGF- β [59], HIF1 α [51], рецептором эстрогенов [41], а также регулирует ответ на изменения концентрации сыворотки [50]. CDK8 идентифицирован как онкобелок, связанный с развитием колоректального рака [47], опухолей поджелудочной [60] и молочной [52, 61–63] желез, меланомы [64]. CDK8 участвует в формировании фенотипа опухолевых стволовых клеток [65].

Поскольку ингибирование CDK8/19 практически безопасно для взрослого организма, использование CDK8/19 в качестве терапевтических мишеней перспективно [41, 66, 67]. Интенсивно развивается изучение соединений различных химических классов, на основе которых предложены фармакологические блокаторы киназной активности CDK8/19 и так называемые соединения-degraders для полной элими-

нации этих белков (преодоление киназонезависимой функции) [68, 69]. Вопросы селективности ингибиторов рассмотрены в обзорах и оригинальных исследованиях [53, 70–73].

Кортистатин А – относительно селективный ингибитор киназной активности CDK8/19. Ингибирование этих протеинкиназ кортистатином А в клетках острого миелоидного лейкоза (линия MOLM-14) усиливало экспрессию «противоопухолевых» генов, контролируемую суперэнхансерами (*CEBPA*, *IRF8*, *IRF1* и *ETV6*), что приводило к замедлению пролиферации клеток. При этом увеличилась экспрессия 20% генов, связанных с суперэнхансерами, и только 3% генов, имеющих обычные энхансеры. Оказалось, что CDK8 связана с суперэнхансерами всех активированных генов (в сравнении с 67% активированных генов, имеющих обычные энхансеры). Ингибированных генов, регулируемых суперэнхансерами, оказалось всего три (1% всех генов, регулируемых суперэнхансерами). Эти соотношения позволяют [33] сделать вывод о том, что именно белки, ассоциированные с суперэнхансерами, – непосредственные мишени кортистати-на А в клетках MOLM-14.

Обработка указанных клеток соединением I-BET151 – ингибитором BRD4 – снижала экспрессию генов, регулируемых суперэнхансерами, хотя результат – противоопухолевый эффект – был таким же, как при действии кортистати-на А. Вероятно, пролиферация опухолевых клеток зависит от «дозировки» экспрессии генов, определяемой суперэнхансерами. Примечательно, что эффекты не суммировались при совместном применении I-BET151 и кортистати-на А, а изменения профиля экспрессии генов полностью совпадали с изменениями, вызванными одним I-BET151. Вероятно, BRD4 необходим для активации транскрипции в ответ на кортистатин А [33].

Клетки острого миелоидного лейкоза характеризуются конститутивной активацией сигнального пути JAK-STAT. Одна из основных мишеней киназной активности CDK8 – транскрипционный фактор STAT1. Содержание фосфорилированной (транскрипционно компетентной) формы pSTAT1S727 повышено в областях суперэнхансеров [8]. Оказалось, что CDK8-зависимое фосфорилирование STAT1 необходимо для быстрой пролиферации лейкозных клеток. При действии кортистати-на А наблюдались замедление пролиферации и активация зависимой от суперэнхансеров экспрессии транскрипционных факторов GATA1, GATA2 и ID2, опосредующих замедление или прекращение пролиферации, а также активация факторов PLEK, CFLAR и UBASH3B, специфичных для мегакариоцитов. В результате наблюдали переход клеток от стволового состояния

к дифференцированному и торможение пролиферации [8].

Ингибиторы CDK8/19 на основе модифицированных пиридинов замедляли пролиферацию клеток колоректального рака [32]. Паттерны экспрессии генов изменялись так же, как при активации некоторых суперэнхансеров. Под действием ингибиторов CDK8/19 опухолевые клетки переходили из стволового фенотипа в дифференцированное состояние. Этот процесс, как упоминалось, связан с активацией суперэнхансеров. С концепцией роста зависимой от суперэнхансеров экспрессии при ингибировании CDK8 согласуется и активация онкогена *c-Myc*, также регулируемого суперэнхансером. Однако интегральный эффект ингибиторов, несмотря на активацию *c-Myc*, оказался противоопухолевым, хотя и умеренным [32].

Kuuluvainen и соавт. [29] попытались найти способ селективной инактивации суперэнхансеров, обеспечивающих высокую экспрессию онкогенов в клетках колоректального рака. Уменьшение уровня CDK8 с помощью РНК-интерференции приводило к интегральному снижению экспрессии генов, регулируемых суперэнхансерами, но селективного снижения экспрессии онкогенов, регулируемых суперэнхансерами, не наблюдалось. К такому снижению приводил нокаун генов *MED12* и *MED13/13L* [29].

В рассмотренных выше примерах ингибирование CDK8/19 не влияло на активированные энхансеры онкогенов, но приводило к активации суперэнхансеров антионкогенов [8, 32, 33]. Противоопухолевый эффект объясняется восстановлением дифференцированного фенотипа и замедлением пролиферации клеток. Таким образом, применение ингибиторов CDK8/19 в терапии отдельных видов опухолей следует рассматривать как опосредованное суперэнхансерами восстановление нормальной экспрессии генов в злокачественных клетках. Вместе с тем, патологический процесс не сводится к нарушениям транскрипции: отдельная роль принадлежит посттранскрипционным и посттрансляционным событиям.

Клинические испытания ингибиторов CDK8/19 находятся на начальных этапах. Соединение SEL120 испытывают в качестве кандидата в препараты против острого миелоидного лейкоза, BCD-115 – при раке молочной железы с экспрессией рецептора эстрогенов, но HER2-негативном. Идентификаторы испытаний, а также анализ причин токсичности ингибиторов CDK8/19 приведены в работе [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. СУПЕРЭНХАНСЕРЫ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА

Детальные исследования структурно-функциональных особенностей организации генома позволили

сформулировать представление о суперэнхансерах как районах с повышенным содержанием транскрипционных комплексов. Не удивительно, что эти участки важны в патогенезе: молекулярные механизмы заболеваний так или иначе связаны с дисрегуляцией транскрипции генов. Особую роль суперэнхансеры приобретают в биологии опухолей: неконтролируемая пролиферация трансформированных клеток, их «ускользание» от терапевтических воздействий (химио- и лучевая терапия) обусловлены не просто активацией транскрипции, но адаптивным изменением профиля экспрессии генов. Следовательно, суперэнхансеры – участки ДНК, несущие мультибелковые транскрипционные «машины», становятся мишенями противоопухолевых воздействий.

Особенно важен вопрос перспективности низкомолекулярных химических модуляторов транскрипционных CDK в терапии опухолей. Эффективность первых ингибиторов CDK оказалась недостаточной, а общерезорбтивная токсичность высокой. В дальнейшем были получены более селективные ингибиторы отдельных транскрипционных протеинкиназ: THZ1 для CDK7, THZ531 для CDK12/13, палбоциклиб и рибоциклиб для CDK4/6. Эти соединения оказывают выраженное противоопухолевое действие в клинических ситуациях и становятся компонентами лечебных режимов [74, 75].

CDK8/19 представляют интерес как уникальная мишень: особая избирательность перепрограммирования транскрипции предоставляет шанс заменить применяемые сегодня токсичные препараты хорошо переносимыми ингибиторами этого механизма. Острый миелоидный лейкоз встречается во всех возрастных группах, но особенно часто у пациентов старше 60 лет. Применяемые в настоящее время лечебные схемы с трудом переносятся из-за кардио-

и миелотоксичности; высока вероятность ранних рецидивов (в течение первого года) [76, 77]. В наших экспериментах селективный ингибитор CDK8/19 сенексин В вызывал гибель клеток острого миелоидного лейкоза (линия MV-4-11) в значительно более низких концентрациях, чем цитозар – один из основных химиопрепаратов, применяемых при этом заболевании. Сенексин В вызывал указанный эффект в концентрациях, нетоксичных для неопухолевых клеток. В культуре клеток хронического миелоидного лейкоза сенексин В повышал противоопухолевое действие таргетных ингибиторов химерной тирозинкиназы Vcr-ABL [78], что расширяет возможности блокирования CDK8/19 в терапии опухолей системы крови. Неудовлетворительными остаются и результаты химиотерапии колоректального рака, особенно метастатической болезни [79, 80], поэтому перспективными представляются результаты изучения этой опухоли, в которых показана эффективность инактивации компонентов комплекса Mediator [29, 32, 81].

Если с общебиологических позиций интерпретация суперэнхансеров как особых «самостоятельных» регуляторных элементов генома может быть затруднительна, несомненной представляется их практическая важность как «аккумуляторов» транскрипционных комплексов для изучения патогенеза и разработки персонализированной терапии. Эта стратегия предусматривает выявление роли конкретного механизма транскрипции у пациента (транскрипционный «портрет») и мишень-направленное воздействие на установленный механизм. ●

*Работа поддержана грантом
Минобрнауки Российской Федерации
(соглашение № 14.W03.31.0020 с Институтом
биологии гена РАН).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Whyte W., Orlando D., Hnisz D., Abraham B., Lin C., Kagey M., Rahl P., Lee T., Young R. // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 307–319.
- Peng X., So K., He L., Zhao Y., Zhou J., Li Y., Yao M., Xu B., Zhang S., Yao H., et al. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. № 15. P. 8785–8805.
- Tang F., Yang Z., Tan Y., Li Y. // NPJ Precis. Oncol. 2020. V. 4. № 1. P. 2.
- Lovén J., Hoke H., Lin C., Lau A., Orlando D., Vakoc C., Bradner J., Lee T., Young R. // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 320–334.
- Parker S., Stitzel M., Taylor D., Orozco J., Erdos M., Akiyama J., Bueren K., Chines P., Narisu N., Black B., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 44. P. 17921–17926.
- Hnisz D., Abraham B., Lee T., Lau A., Saint-André V., Sigova A., Hoke A., Young R. // Cell. 2013. V. 155. № 4. P. 934–947.
- Hnisz D., Schuijers J., Lin C.Y., Weintraub A., Abraham B., Lee T., Bradner J., Young R. // Mol. Cell. 2015. V. 58. № 2. P. 362–370.
- Nitulescu I., Meyer S., Wen Q., Crispino D., Lemieux M., Levinee R., Pelish H., Shair M. // EBioMedicine. 2017. V. 26. P. 112–125.
- Thandapani P. // Pharmacol. Ther. 2019. V. 199. P. 129–138.
- Peng Y., Zhang Y. // Animal Model Exp. Med. 2018. V. 1. № 3. P. 169–179.
- The comprehensive human Super-Enhancer database (<http://www.licpathway.net/sedb>) // Date of the application: 05.08.2020.
- Pott S., Lieb J. // Nat. Genet. 2014. V. 47. № 1. P. 8–12.
- Hnisz D., Shrinivas K., Young R., Chakraborty A., Sharp P. // Cell. 2017. V. 169. № 1. P. 13–23.
- Chapuy B., McKeown M., Lin C., Monti S., Roemer M., Qi J., Rahl P., Sun H., Yeda K., Doench J., et al. // Cancer Cell. 2013. V. 24. № 6. P. 777–790.
- Ball B., Abdel-Wahab O. // Trends Pharmacol. Sci. 2018. V. 39. № 12. P. 1002–1004.
- Tan Y., Li Y., Tang F. // Mol. Cancer. 2020. V. 19. № 1. P. 74.
- Ghazzoui N., Issaoui H., Saintamand A., Oblet C., Carrion C.,

- Denizot Y. // *Blood Adv.* 2018. V. 2. № 3. P. 252–262.
18. Santos J, Braikia F, Oudinet C, Joana M, Dauba A, Khamlichi A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 29. P. 14708–14713.
19. Lio C, Shukla V, Samaniego-Castruita D, González-Avalos E, Chakraborty A, Yue X, Schatz D, Rao A. // *Sci. Immunol.* 2019. V. 4. № 34. P. eaau7523.
20. Loft A, Forss I, Siersbæk M, Schmidt S, Larsen A, Madsen J, Pisani D, Nielsen R, Aagaard M, Mathison A, et al. // *Genes Dev.* 2014. V. 29. № 1. P. 7–22.
21. Martinez M, Medrano S, Brown E, Tufan T, Shang S, Bertocello N, Guessoum O, Adli M, Belyea B, Sequeira-Lopez M, Gomez R. // *J. Clin. Invest.* 2018. V. 128. № 11. P. 4787–4803.
22. Huang S, Li X, Zheng H, Si X, Li B, Wei G, Li C, Chen Y, Chen Y, Liao W, et al. // *Circulation.* 2019. V. 139. № 25. P. 2857–2876.
23. Brown J, Lin C, Duan Q, Griffin G, Federation A, Paranal R, Bair S, Newton G, Lichtman A, Kung A, et al. // *Mol. Cell.* 2014. V. 56. № 2. P. 219–231.
24. Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuta T, Nishikawa R, Noguuchi M, Sato-Otsubo A, et al. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2013. V. 52. № 9. P. 802–816.
25. Herranz D, Ambesi-Impiombato A, Palomero T, Schnell S, Belver L, Wendorff A, Xu L, Castillo-Martin M, Llobet-Navás D, Cordon-Cardo C, et al. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 10. P. 1130–1137.
26. Zhang X, Choi P, Francis J, Imielinski M, Watanabe H, Cherniack A, Meyerson M. // *Nat. Genet.* 2015. V. 48. № 2. P. 176–182.
27. Zhang X, Choi P, Francis J, Gao G, Campbell J, Ramachandran A, Mitsuishi Y, Ha G, Shih J, Vazquez F, et al. // *Cancer Discov.* 2018. V. 8. № 1. P. 108–125.
28. Mansour M, Abraham B, Anders L, Berezovskaya A, Gutierrez A, Durbin A, Etchin J, Lawton L, Sallan S, Silverman L, et al. // *Science.* 2014. V. 346. № 6215. P. 1373–1377.
29. Kuuluvainen E, Doménech-Moreno E, Niemelä E, Mäkelä T. // *Mol. Cell Biol.* 2018. V. 38. № 11. P. e00573–17.
30. Gimple R, Kidwell R, Kim L, Sun T, Gromovsky A, Wu Q, Wolf M, Lv D, Bhargava S, Jiang L, et al. // *Cancer Discov.* 2019. V. 9. № 9. P. 1248–1267.
31. Hu Y, Zhang Z, Kashiwagi M, Yoshida T, Joshi I, Jena N, Somasundaram R, Emmanuel A, Sigvardsson M, Fitamant J, et al. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 17. P. 1971–1990.
32. Clarke P, Ortiz-Ruiz M, TePoele R, Adeniji-Popoola O, Box G, Court W, Czasch S, Bawab S, Eudar C, Ewan K, et al. // *eLife.* 2016. V. 5. P. e20722.
33. Pelish H, Liau B, Nitulescu I, Tangpeerachaikul A, Poss Z, Da Silva D, Caruso B, Arefolov A, Fadeyi O, Christie A, et al. // *Nature.* 2015. V. 526. № 7572. P. 273–276.
34. Shi J, Whyte W, Zepeda-Mendoza C, Milazzo J, Shen C, Roe J, Minder J, Mercan F, Wang E, Eckersley-Maslin M, et al. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 24. P. 2648–2662.
35. Hnisz D, Weintraub A, Day D, Valton A, Bak R, Li C, Goldmann J, Lajoie B, Fan Z, Sigova A, et al. // *Science.* 2016. V. 351. № 6280. P. 1454–1458.
36. Zhou H, Schmidt S, Jiang S, Willox B, Bernhardt K, Liang J, Johannsen E, Kharchenko P, Gewurz B, Kieff E, et al. // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. № 2. P. 205–216.
37. Alqahtani A, Choucair K, Ashraf M, Hammouda D, Alloghbi A, Khan T, Senzer N, Nemunaitis J. // *Future Sci. OA.* 2019. V. 5. № 3. FSO372.
38. Borthakur G, Wolff J, Aldoss I, Hu B, Dinh M, Torres A, Chen X, Rizzieri D, Sood A, Odenike O, et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 5. P. 7019.
39. Sobhani N, D'Angelo A, Pittacolo M, Roviello Z, Miccoli A, Corona S, Bernocchi O, Generali D, Otto T. // *Cells.* 2019. V. 8. № 4. P. 321.
40. Kennedy A, Vallurupalli M, Chen L, Crompton B, Cowley G, Vazquez F, Weir A, Tsherniak A, Parasuraman S, Kim S, et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. P. 30178–30193.
41. Chou J, Quigley D, Robinson T, Feng F, Ashworth A. // *Cancer Discov.* 2020. V. 10. № 3. P. 351–370.
42. Greenleaf A. // *Transcription.* 2019. V. 10. № 2. P. 91–110.
43. Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl P, Abraham B, Reddy J, Ficarro S, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, et al. // *Nature.* 2014. V. 511. № 7511. P. 616–620.
44. Rix U, Superti-Furga G. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. № 9. P. 616–624.
45. Chipumuro E, Marco E, Christensen C, Kwiatkowski N, Zhang T, Hatheway C, Abraham B, Sharma B, Yeung C, Altabef A, et al. // *Cell.* 2014. V. 159. № 5. P. 1126–1139.
46. A Study of SY 5609, a Selective CDK7 Inhibitor, in Advanced Solid Tumors (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04247126>) // Date of the application: 05.08.2020.
47. Zhang T, Kwiatkowski N, Olson C, Dixon-Clarke S, Abraham B, Greifenberg A, Ficarro S, Elkins J, Liang Y, Hannett N, et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2016. V. 12. P. 876–884.
48. Liang S, Hu L, Wu Z, Chen Z, Liu S, Xu X, Qian A. // *Cells.* 2020. V. 9. № 6. P. 1483.
49. Galbraith M, Donner A, Espinosa J. // *Transcription.* 2010. V. 1. P. 4–12.
50. Donner A, Ebmeier C, Taatjes D, Espinosa J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 194–201.
51. Galbraith M, Allen M, Bensard C, Wang X, Schwinn M, Qin B, Long H, Daniels D, Hahn W, Dowell R, et al. // *Cell.* 2013. V. 153. P. 1327–1339.
52. McDermott M, Chumanevich A, Lim C, Liang J, Chen M, Alttila S, Oliver D, Rae J, Shtutman M, Kiaris H, et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 12558–12575.
53. Chen M, Liang J, Ji H, Yang Z, Alttila S, Hu B, Schronce A, McDermott M.S.J., Schools G.P., Zik C.U., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. P. 10208–10213.
54. McClelland M, Soukup T, Liu S, Esensten J, de Sousa E Melo, Yaylaoglu M, Warming S, Roose-Girma M, Firestein R. // *J. Pathol.* 2015. V. 237. P. 508–519.
55. Westerling T, Kuuluvainen E, Makela T. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 6177–6182.
56. Loncle N, Boube M, Joulia L, Boschiero C, Werner M, Cribbs D, Bourbon H. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 1045–1054.
57. Xie X, Hsu F, Gao X, Xu W, Ni J, Xing Y, Huang L, Hsiao H, Zheng H, Wang C, et al. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 7. P. e1002207.
58. Firestein R, Bass A, Kim S, Dunn I, Silver S, Guney I, Freed E, Ligon A, Vena N, Ogino S, et al. // *Nature.* 2008. V. 455. P. 547–551.
59. Alarcon C, Zaromytidou A, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller A, Manova-Todorova K, Macias M, et al. // *Cell.* 2009. V. 139. P. 757–769.
60. Xu W, Wang Z, Zhang W, Qian K, Li H, Kong D, Li Y, Tang Y. // *Cancer Lett.* 2015. V. 356. P. 613–627.
61. Porter D, Farmaki E, Alttila S, Schools G, West D, Chen M, Chang B, Puzyrev A, Lim C, Rokow-Kittell R, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 13799–13804.
62. Broude E, Gyorfy B, Chumanevich A, Chen M, McDermott M, Shtutman M, Catroppo J, Roninson I. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2015. V. 15. P. 739–749.
63. Xu D, Li C, Zhang X, Gong Z, Chan C, Lee S, Jin G, Rezaeian A, Han F, Wang J, et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6641.

64. Kapoor A., Goldberg M., Cumberland L., Ratnakumar K., Segura M., Emanuel P., Menendez S., Vardabasso C., Leroy G., Vidal C., et al. // *Nature*. 2010. V. 468. P. 1105–1109.
65. Adler A., McClelland M., Truong T., Lau S., Modrusan Z., Soukup T., Roose-Girma M., Blackwood E., Firestein R. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. P. 2129–2139.
66. Menzl I., Witalisz-Siepracka A., Sexl V. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. V. 12. № 2. P. 92.
67. Xi M., Chen T., Wu C., Gao X., Wu Y., Luo X., Du K., Yu L., Cai T., Shen R., Sun H., et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 164. P. 77–91.
68. Solum E., Hansen T., Aesoy R., Herfindal L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28. № 10. P. 115461.
69. Hatcher J., Wang E., Johannessen L., Kwiatkowski N., Sim T., Gray N. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2018. V. 9. № 6. P. 540–545.
70. Philip S., Kumarasiri M., Teo T., Yu M., Wang S. // *J. Med. Chem.* 2018. V. 61. № 12. P. 5073–5092.
71. Chen M., Li J., Liang J., Thompson Z., Kathrein K., Broude E., Roninson I. // *Cells*. 2019. V. 8. № 11. P. 1413.
72. Chen W., Ren X., Chang C. // *ChemMedChem*. 2019. V. 14. № 1. P. 107–118.
73. He L., Zhu Y., Fan Q., Miao D., Zhang S., Liu X., Zhang C. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019. V. 29. № 4. P. 549–555.
74. Jia Q., Chen S., Tan Y., Li Y., Tang F. // *Exp. Mol. Med.* 2020. V. 52. № 5. P. 713–723.
75. Sengupta S., George R. // *Trends Cancer*. 2017. V. 3. № 4. P. 269–281.
76. Brinda B., Khan I., Parkin B., Konig H. // *J. Cell. Mol. Med.* 2018. V. 22. № 3. P. 1411–1427.
77. Tan Y., Wu Q., Zhou F. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2020. V. 152. P. 102993.
78. Khamidullina A., Tatarskiy V., Yastrebova M., Nuzhina J., Ivanova E., Lim C.-U., Chen M., Broude E., Roninson I., Shtil A. // *Proc. EACR conference «A Matter of Life and Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities»*. Italy, 2020. P. 60.
79. Feng S., Yan P., Zhang Q., Li Z., Li C., Geng Y., Wang L., Zhao X., Yang Z., Cai H., Wang X. // *Int. J. Colorectal Dis.* 2020. V. 35. P. 1355–1369.
80. Kotani D., Kuboki Y., Horasawa S., Kaneko A., Nakamura Y., Kawazoe A., Bando H., Taniguchi H., Shitara K., Kojima T., et al. // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 1253.
81. Liang J., Chen M., Hughes D., Chumanevich A., Altilla S., Kaza V., Lim C., Kiaris H., Myhre K., Pena M., et al. // *Cancer Res*. 2018. V. 78. № 3. P. 6594–6606.

УДК 577.21

Модификаторы хроматина в регуляции транскрипции: свежие находки и перспективы

М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева*

Институт биологии гена РАН, группа динамики транскрипционных комплексов, Москва, 119334 Россия

*E-mail: vorobyeva@genebiology.ru

Поступила в редакцию 28.07.2020

Принята к печати 17.12.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11101

РЕФЕРАТ Комплексы, модифицирующие и ремоделирующие гистоны, считаются основными корегуляторами, которые изменяют структуру хроматина и влияют тем самым на транскрипцию. Согласованная работа этих комплексов необходима для активации транскрипции любого гена эукариот. В данном обзоре мы обсуждаем современные направления в исследовании модификаторов гистонов и факторов, ремоделирующих хроматин: механизмы функционирования белков и транскрипционных комплексов-пионеров; ремоделирование и модификация комплексами негистоновых белков; дополнительные функции некаталитических субъединиц ремоделирующих факторов, а также участие модификаторов гистонов в «паузе» РНК-полимеразы II. Приведены также схемы, иллюстрирующие механизмы рекрутирования основных классов факторов, ремоделирующих и модифицирующих хроматин, в различные сайты генома, а также их функциональные активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транскрипция, хроматин, энхансер, корегулятор, ремоделирование, транскрипционный фактор.

ВВЕДЕНИЕ

Активация транскрипции генов эукариот начинается со связывания белка-активатора (например, рецептора гормона) с регуляторным элементом гена. Активаторный белок при участии комплексов-корегуляторов привлекает на ген общие факторы транскрипции. Именно мультибелковые корегуляторные комплексы координируют процесс транскрипции – они интегрируют сигналы от различных ДНК-связывающих активаторов, а также модификаций хроматина и передают их на общие факторы транскрипции (рис. 1А). Модификаторы хроматина, которые входят в число основных корегуляторных комплексов, участвующих в транскрипции любого гена, подразделяются на две большие, функционально различные группы: комплексы, изменяющие положение нуклеосом, и комплексы, ковалентно модифицирующие гистоны в составе хроматина (рис. 1Б).

Известно, что в активации транскрипции участвуют сотни различных белков. Все вместе они не могут оставаться связанными с регуляторными элементами активируемого гена на протяжении всего процесса активации (хотя такая возможность предполагалась ранее в рамках гипотезы «гистонового кода»). В настоящее время транскрипционный процесс представляется чрезвычайно динамичным: он

состоит из множества этапов, за каждый из которых отвечают разные транскрипционные комплексы. Эта модель регуляции транскрипции получила название «трещоточного механизма» (рис. 1В) [1]. В соответствии с этой моделью промежуточными маркерами, регулируемыми направленный обмен транскрипционных комплексов на ДНК, являются ковалентные модификации гистонов [2, 3]. Ковалентные модификации могут способствовать не только привлечению, но и удалению транскрипционных комплексов с регуляторного элемента, стимулируя, тем самым, динамику процесса транскрипции. Показано, что снижение времени ассоциации транскрипционных регуляторов с ДНК усиливает активацию транскрипции [4]. Модель «трещоточного механизма» хорошо иллюстрирует возможность функционирования большого количества белков на регуляторном элементе одного гена. При этом сохранение информации от предыдущих корегуляторов в виде модификации на хроматине позволяет поддерживать общее направление регулируемого процесса (движение в сторону активной работы регуляторного элемента или, наоборот, подавление его активности).

В нашем обзоре информация о функциональных свойствах и механизмах рекрутирования комплексов-модификаторов хроматина суммирована в виде

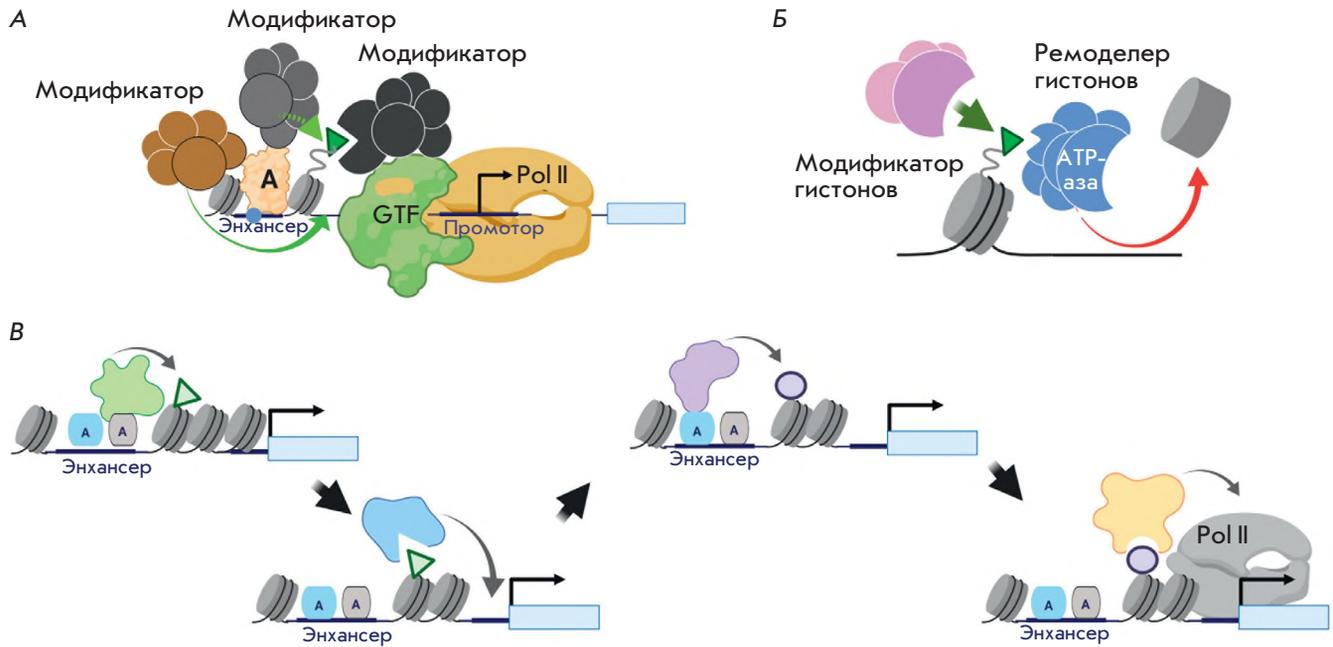


Рис. 1. А – общая модель активации транскрипции генов эукариот. А – белок-активатор транскрипции; GTF – основные факторы транскрипции; Pol II – РНК-полимераза II. Б – основные классы модификаторов хроматина: белковые комплексы, изменяющие положение нуклеосом, и комплексы, ковалентно модифицирующие гистоны в составе хроматина. В – молекулярная модель транскрипционного процесса по механизму «трещотки». В соответствии с данным механизмом ковалентные модификации хроматина являются связующими элементами, способствующими смене транскрипционных комплексов на регуляторном элементе. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приводятся ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

схемы (рис. 2), которая включает ссылки на научные исследования, описывающие отдельные свойства рассматриваемых модификаторов хроматина. Более детально мы остановились на тех областях исследования модификаторов хроматина, в которых за последние годы достигнуты значительные успехи. Кроме того, обсуждаются некоторые вопросы изучения модификаторов, на которые до сих пор нет однозначного ответа.

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ СВОЙСТВ КОАКТИВАТОРОВ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА ХРОМАТИН

Транскрипционные комплексы, изменяющие положение нуклеосом

Вместе с возникновением хроматина в ходе эволюции (упаковка ДНК в фибриллы при помощи гистоновых белков) важнейшим этапом регуляции транскрипции генов стала возможность оказывать воздействие на упаковку хроматина, определяя тем самым доступность регуляторных элементов ДНК. К транскрипционным корегуляторам, влияющим на состояние хроматина, относятся белковые ком-

плексы, так называемые «ремоделеры» хроматина [58, 59] – эволюционно-консервативные транскрипционные комплексы, представленные в клетках всех эукариотических организмов – от дрожжей до человека. Причем субъединичный состав данных комплексов меняется в ходе эволюции, однако их свойства (способность определенным образом влиять на положение нуклеосом), а также состав коровых субъединиц остаются практически неизменными.

Молекулярный механизм работы факторов-пионеров

Основную роль в специфичности регуляции транскрипции эукариот играют ДНК-связывающие факторы. Именно набор транскрипционных факторов, ассоциированных с регуляторным элементом, влияет на вид его активности (функционирования в качестве энхансера, сайленсера или инсулятора), которая реализуется путем привлечения различных транскрипционных комплексов. Принято считать, что большинство транскрипционных факторов (например, ядерные рецепторы) не способны связываться с регуляторным участком ДНК, занятым нуклеосомами. Полагают, что за функцию освобождения

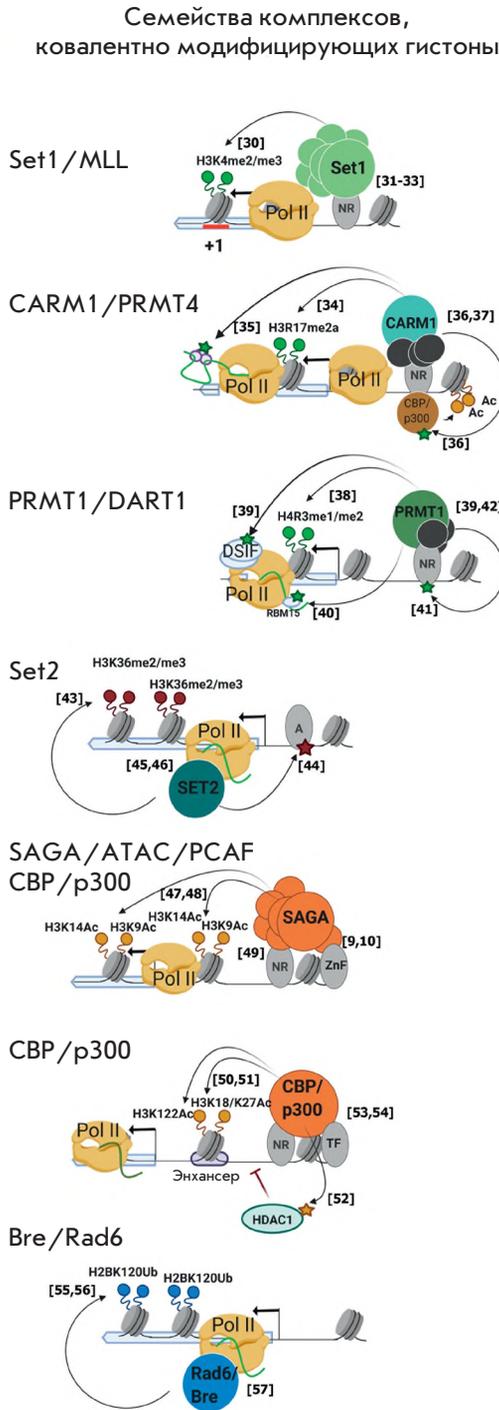
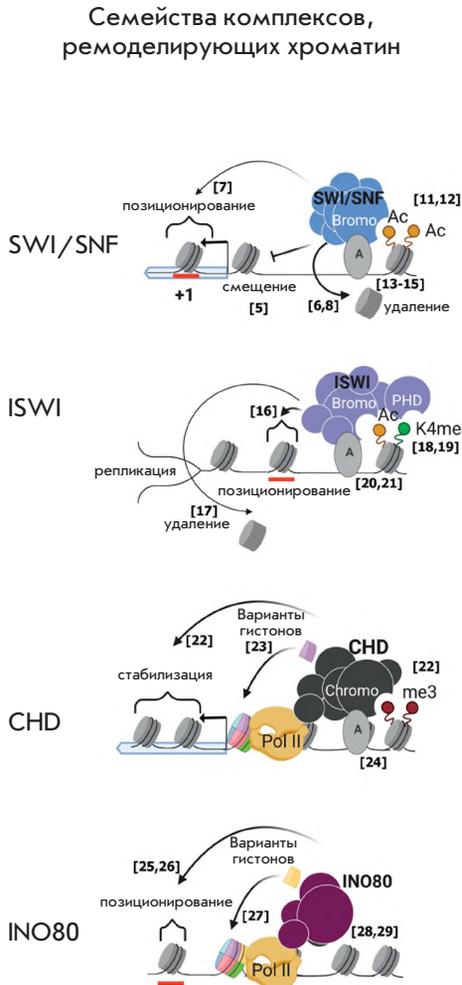


Рис. 2. Функциональные особенности и механизмы рекрутирования на хроматин ремоделеров и модификаторов гистонов. Используемые сокращения: А – активатор, NR – ядерный рецептор, TF – транскрипционный фактор. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

регуляторных элементов ДНК от компактизированного хроматина отвечает специальный класс ДНК-связывающих белков, названный факторами-пионерами (pioneer factors), яркими примерами которых являются FoxA и GATA [60]. Эти факторы-пионеры обладают особым свойством – способностью связывать регуляторные элементы ДНК, находящиеся в компактизированном хроматине, и приводить их в состояние, компетентное для связывания други-

ми транскрипционными факторами. Таким образом, факторы-пионеры по сути представляют собой первичные регуляторы-ремоделеры, инициирующие изменение структуры хроматина, которое поддерживается в дальнейшем ремоделирующими транскрипционными комплексами. Несмотря на то что концепция факторов-пионеров была представлена почти 10 лет назад, молекулярный механизм функционирования данных белков остается не до конца ясным.

Исходно представлялось, что факторы-пионеры функционируют сами по себе, не нуждаясь в участии ремоделирующих комплексов (это предположение было основано на способности данных белков связывать хроматинизированную ДНК *in vitro*) [61]. При этом уже довольно давно отмечено, что факторы-пионеры *in vivo* способны достаточно сложным образом воздействовать на хроматин (например, проводить замену H2A на H2A.Z), что вряд ли под силу отдельному белку-мономеру [62].

В настоящее время представляется маловероятным, что факторы-пионеры функционируют в живой клетке в виде одного белка. Скорее всего, их уникальная способность воздействовать на компактизированный хроматин является следствием кооперативных мультибелковых взаимодействий. Примером такого совместного функционирования может быть работа фактора-пионера в паре с ядерным рецептором (например, фактора FoxA1 и ядерного рецептора ER α) [63]. Достаточно давно известно, что FoxA1 и ER α кооперативно связываются с ДНК. Однако раньше предполагали, что фактор-пионер все-таки занимает в данном процессе лидирующую позицию (именно подавление экспрессии FoxA1 приводит к удалению

90% геномных сайтов ER α при очень слабом обратном эффекте в реципрокном эксперименте) [64]. Тем не менее, дальнейшие исследования выявили более значимую роль ядерных рецепторов в освобождении регуляторных сайтов ДНК от компактизированного хроматина. Оказалось, что обработка клеток MCF-7 эстрадиолом (сенсором которого является ER α) приводит к увеличению почти на 30% количества сайтов связывания FoxA1, демонстрируя тем самым способность ER α выступать в качестве фактора-пионера как минимум для некоторых сайтов FoxA1 (рис. 3А) [65]. Вероятно, способность ядерного рецептора действовать как фактор-пионер может быть основана на его взаимодействии с транскрипционными комплексами – ремоделерами хроматина. Известно, что многие стероидные рецепторы используют ремоделирующие комплексы SWI/SNF и NURF для декомпактизации хроматина на ранних стадиях активации транскрипции [66, 67]. Предложена гипотеза, согласно которой существует возможность формирования общего комплекса между ядерным рецептором и комплексом-ремоделером не на хроматине, а в нуклеозоме [67]. Такая пара будет эффективным фактором-пионером, способным взаимодействовать

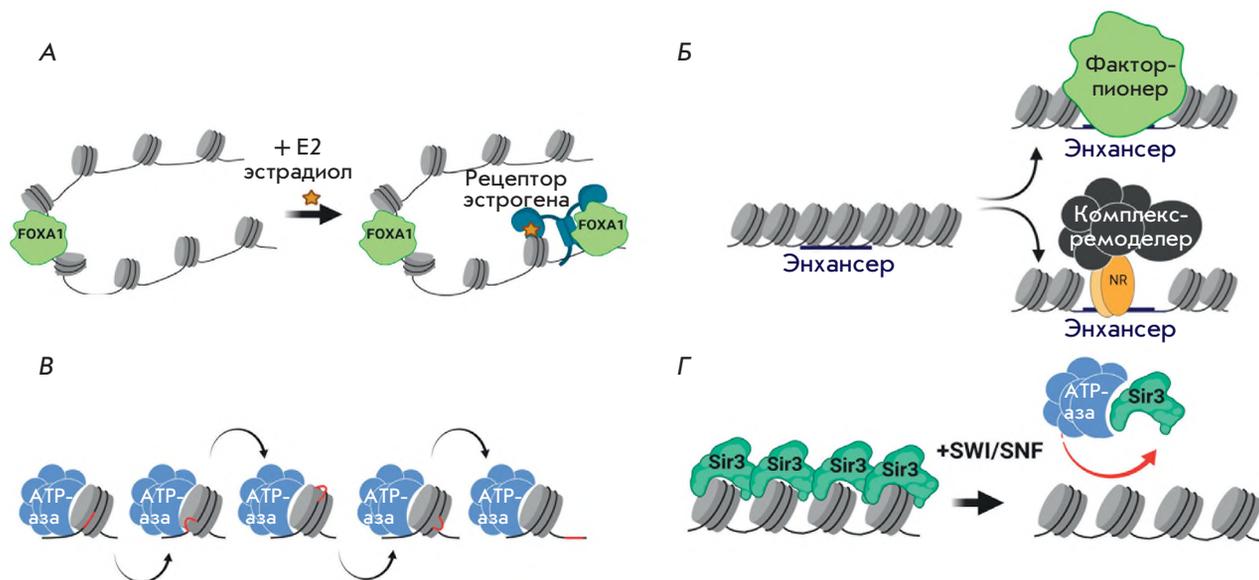


Рис. 3. А – совместное функционирование фактора-пионера FoxA1 и ядерного рецептора ER α в освобождении регуляторных сайтов ДНК от компактизированного хроматина. Б – первичное связывание регуляторов транскрипции с регуляторными элементами ДНК, занятыми компактизированным хроматином, может осуществляться как специализированными ДНК-связывающими факторами-пионерами, так и комплексами-ремоделерами хроматина, ассоциированными с ядерными рецепторами. В – основной молекулярный механизм работы всех комплексов-ремоделеров состоит в образовании петли ДНК на нуклеосоме, которая постепенно сдвигается относительно гистонового октамера. Г – влияние ремоделера хроматина SWI/SNF на связывание белка-репрессора Sir3p с хроматином. Комплекс SWI/SNF у дрожжей способен взаимодействовать с гетерохроматиновым репрессором Sir3p и удалять его с хроматина. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приведены ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

с регуляторными участками в составе компактизованного хроматина (рис. 3Б). Для того чтобы понять, насколько распространен данный молекулярный механизм, необходимы дальнейшие исследования.

Функциональная активность комплексов, ремоделирующих хроматин. Возможность ремоделирования негистоновых белков

Если механизм организации первичного доступа к регуляторным элементам компактизованного хроматина остается до сих пор неясным, то поддержание областей, свободных от нуклеосом, несомненно входит в зону ответственности транскрипционных комплексов, ремоделирующих хроматин. В целом, комплексы-ремоделеры способны воздействовать на нуклеосомы самым различным образом: удалять их, сдвигать, позиционировать и заменять гистоны альтернативными вариантами. Однако в основе всех этих механических функций лежит одна и та же способность ремоделеров создавать петлю ДНК в составе нуклеосомы и изменять ее положение относительно поверхности нуклеосомы (рис. 3В) [58]. Субъединичный состав комплексов-ремоделеров, а также особенности строения АТФ-азных субъединиц (наличие дополнительных доменов, обладающих способностью связывать гистоны определенного типа) определяют функциональную способность транскрипционных комплексов. Так, комплексы семейства SWI/SNF, ферментативная субъединица которых содержит домен SnAC, связывающий нуклеосомы, отвечают за удаление целых нуклеосом из хроматина [68]. Комплексы семейства INO80, АТФ-аза которых содержит двухсоставной транслокационный домен, способны заменять гистоны в составе нуклеосом на альтернативные варианты [27]. Семейство АТФ-азы ISWI, С-концевой HSS-домен которой связывает немодифицированные гистоны H3 и участки линкерной ДНК, участвует в корепликативной сборке хроматина, помогая шаперонам формировать полноценные нуклеосомы в составе хроматина [69]. Кроме того, комплексы-ремоделеры семейств ISWI и CHD используют свои HSS- и DBD-домены для правильного пострепликативного позиционирования нуклеосом в хроматине [16].

Стоит отметить, что комплексы, ремоделирующие хроматин, способны влиять не только на положение нуклеосом на ДНК, но также и на ассоциацию других ДНК-связывающих белков с хроматином [70]. Способность транслокационных доменов ремоделеров связывать и вызывать перемещение транскрипционных факторов и репрессоров транскрипции может играть значительную роль в регуляции транскрипции. Так, обнаружено, что АТФ-аза комплекса SWI/SNF дрожжей способна взаимодействовать

с репрессором Sir3p гетерохроматина и удалять его с нуклеосомных матриц *in vitro* [71]. Совсем недавно показали, что именно комплекс SWI/SNF необходим *in vivo* для снятия репрессивного эффекта Sir3p с его генов-мишеней и их экспрессии в M/G1-фазе клеточного цикла (рис. 3Г) [72].

Показана функциональная роль ремоделирующего комплекса SWI/SNF в преодолении Рс-зависимой репрессии у различных организмов [73]. Особенно широко изучено взаимосвязанное нарушение функций этих молекулярных систем в процессе онкотрансформации клеток [74]. До недавнего времени предполагалось, что SWI/SNF-комплексы могут играть косвенную роль в удалении комплексов PRC с хроматина. Однако последние эксперименты по искусственному рекрутированию SWI/SNF к Рс-репрессированному локусу указывают на возможность непосредственного удаления PRC-комплексов при помощи SWI/SNF (искусственное рекрутирование последнего комплекса приводило к снижению уровня PRC в течение нескольких минут и не зависело от рекрутирования РНК-полимеразы II к исследуемому локусу) (рис. 4А) [75]. Роль ремоделирующих комплексов в удалении транскрипционных факторов с хроматина, вполне вероятно, гораздо более значительна, чем известно на сегодняшний день. К сожалению, изучение данного механизма *in vivo* представляет чрезвычайно трудную методическую задачу, так как почти всегда результаты исследований могут быть поставлены под сомнение косвенными экспериментальными эффектами.

Некаталитическая роль ремоделирующих комплексов в регуляции транскрипции

Многие хроматинремоделирующие комплексы, кроме ферментативной субъединицы, ответственной за перемещение гистонов [76], содержат и другие субъединицы, количество которых увеличивается в ходе эволюции [77]. Ранее считалось, что некаталитические субъединицы комплексов-ремоделеров хроматина ответственны за специфичность рекрутирования комплексов на хроматин. Было показано, что снижение внутриклеточного уровня отдельных некаталитических субъединиц SWI/SNF дрозофилы приводит к полному нарушению связывания данного комплекса с хроматином при сохранности его корового модуля, содержащего АТФ-азу [78]. Однако в последнее время отношение к функциональным возможностям некаталитических субъединиц ремоделеров несколько изменилось. Появились данные, позволяющие предполагать наличие дополнительных функций у комплексов-ремоделеров, за которые ответственны именно некаталитические субъединицы. Стоит отметить, что такое развитие ситуации вы-

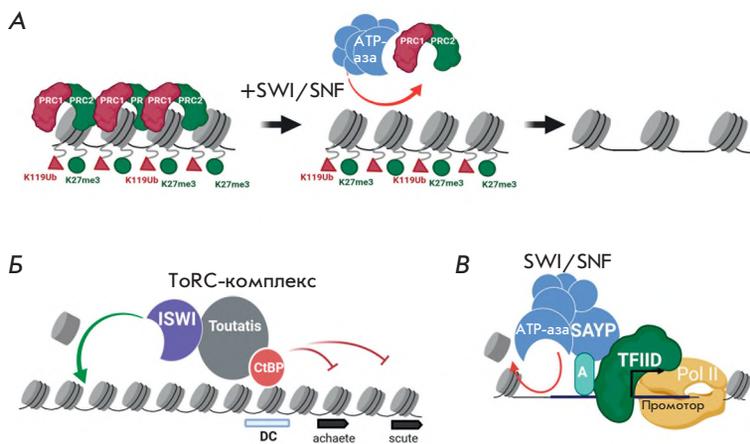


Рис. 4. А – искусственное рекрутирование комплекса SWI/SNF приводит к снижению уровня PRC в репрессированном локусе. Б – ремоделер ISWI в составе репрессорного комплекса ToRC дрозофилы взаимодействует с репрессором транскрипции CtBP, причем CtBP усиливает ремоделирующие свойства ISWI, а ISWI участвует в репрессии транскрипции CtBP-зависимых генов. В – субъединица SAYP комплекса SWI/SNF рекрутирует SWI/SNF и TFIIID на сайты в геноме дрозофилы. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приведены ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

глядит достаточно логичным с эволюционной точки зрения. Процессы активации и репрессии транскрипции чрезвычайно динамичные и сложные. В ходе этих процессов множество многокомпонентных комплексов с большой скоростью обменивается в ограниченном пространстве (на регуляторных элементах ДНК). Подобный обмен предполагает высокую вероятность контактов между участниками и, соответственно, возможность положительной и отрицательной взаимной регуляции. Комплексы-ремоделеры хроматина в ходе своей работы на регуляторном элементе приносят множество дополнительных некаталитических субъединиц. Вполне вероятно, что пока ATP-азная часть комплекса осуществляет свою основную каталитическую функцию, остальные субъединицы могут участвовать также в процессе активации/репрессии транскрипции [79]. Лучше всего охарактеризована ассоциация ATP-азных субъединиц комплексов-ремоделеров с транскрипционными репрессорами. В ходе исследования репрессорного комплекса ToRC дрозофилы была описана способность ферментативной субъединицы-ремоделера ISWI физически взаимодействовать с репрессором транскрипции CtBP [80]. Причем ATP-азная и репрессорная субъединицы в составе данного комплекса взаимно влияют друг на друга: CtBP усиливает способность ISWI удалять или встраивать нуклеосомы, а ISWI, судя по всему, вовлечен в осуществление транскрипционной репрессии на CtBP-зависимых генах (рис. 4Б). Другой фермент-ремоделер, хромодоменсодержащая ATP-аза CHD4/Mi-2, также обладает способностью объединяться с другими белками, формируя комплекс NuRD, репрессирующий транскрипцию [81]. Этот репрессорный комплекс содержит существенно больше субъединиц, чем описанный выше комплекс ToRC. Субъединицы в составе NuRD образуют динамично взаимодействующие между собой модули, обладающие ремоделирующей

активностью за счет субъединицы CHD4/Mi-2 или гистон-деацетилазной активностью за счет Rpd3 [82]. Функциональная роль NuRD включает одновременный контроль плотности нуклеосом и уровня их ковалентных модификаций на энхансерах, управляющих транскрипцией генов развития [83].

Интересно, что ATP-азная субъединица комплекса SWI/SNF (белок BRM) способна репрессировать транскрипцию независимо от ее каталитической активности [84, 85]. С какими дополнительными субъединицами объединяется BRM для осуществления своей репрессорной функции еще не установлено. Однако, по-видимому, можно предложить механизм участия SWI/SNF в активации транскрипции, не зависящий от ATP-азной активности данного комплекса. Около 10 лет назад обнаружили, что SWI/SNF дрозофилы способен физически взаимодействовать с общим фактором транскрипции TFIIID посредством его SAYP-субъединицы [79, 86]. Показано, что эта субъединица играет ключевую роль в привлечении SWI/SNF-комплекса на половину его геномных мишеней [87]. Взаимодействие с TAF5 позволяет SAYP рекрутировать на его геномные мишени не только ремоделирующий комплекс SWI/SNF, но и TFIIID, способствуя формированию преинициаторного комплекса (рис. 4В) [79, 88, 89]. Таким образом, некаталитическая субъединица SWI/SNF является бифункциональным регулятором, способствующим одновременно и ремоделированию хроматина, и инициации транскрипции.

Транскрипционные комплексы, ковалентно модифицирующие гистоны

С момента появления гипотезы «гистонового кода» белки, способные осуществлять ковалентную модификацию гистонов, стали предметом многочисленных исследований [90]. Долгое время предполагалось, что именно набор модификаций гистонов определяет набор транскрипционных комплексов, ассоциирован-

ных с регуляторными элементами генома (что и является концепцией «гистонового кода»). В настоящее время исследователи склоняются к тому, что наличие определенной модификации хроматина можно считать достаточным условием для рекрутирования лишь ограниченного числа регуляторов [1]. В большинстве случаев связывание модификации гистона служит лишь дополнительным фактором привлечения транскрипционного регулятора или может совсем не влиять на его привлечение на хроматин.

Роль ковалентных модификаций гистонов в привлечении транскрипционных комплексов на хроматин

Исходно гипотезу «гистонового кода» изучали в контексте процесса активации транскрипции. Многие исследователи пытались обнаружить гистоновые модификации, определяющие рекрутирование белковых комплексов, стимулирующих транскрипцию. В свою очередь в составе белковых комплексов пытались определить домены, отвечающие за привлечение комплексов к соответствующей «активирующей» модификации. Стоит отметить, что многие из таких исследований не увенчались успехом. Оказалось, что подобные «активирующие» модификации гистонов зачастую не способны в одиночку рекрутировать транскрипционный комплекс. Ярким примером «активирующей» модификации со сложной историей изучения является триметилирование гистона H3 по положению 4 (H3K4me3). Действительно, получено много свидетельств о корреляции между наличием данной модификации на промоторе и активной работой соответствующего гена [91]. Однако роль данной модификации в привлечении транскрипционных регуляторов к промоторам не столь однозначна. В различных белковых комплексах обнаружены домены, способные специфически взаимодействовать с модификацией H3K4me3 (особенно стоит отметить комплексы TFIID, NURF, mSin3a-HDAC1 и SAGA) [92, 93]. Впервые специфический домен, связывающий модификацию H3K4me3, обнаружили в белке ING2, входящем в состав комплекса mSin3a-HDAC1, который репрессирует транскрипцию [94]. Однако почти сразу выяснилось, что нарушение взаимодействия между ING2 и H3K4me3-модификацией гистона приводит скорее к изменению функциональной активности комплекса (снижению деацетилирующей активности), чем к нарушению его рекрутирования [95]. Сходным образом развивалось и изучение домена, распознающего модификацию H3K4me3, в составе регулятора структуры хроматина CHD1 [96]. Оказалось, что специфическое взаимодействие CHD1 с этой модификацией нарушает функциональную активность комплекса, но не препятствует его вза-

имодействию с хроматином [97]. Следует отметить, что положительный вклад белковых доменов, распознающих модификацию H3K4me3, в рекрутирование комплексов к сайтам в геноме все-таки удалось показать в случае TFIID и NURF [98–100].

Судя по всему, процесс привлечения белковых комплексов к регуляторным элементам ДНК более сложен, чем мы представляли ранее: он не реализуется за счет отдельных белок-белковых взаимодействий (например, между модификацией гистона и отдельным белковым доменом, «читающим» модификацию, или между ДНК-связывающим транскрипционным фактором и субъединицей белкового комплекса). Белковые комплексы, регулирующие транскрипцию, чаще всего состоят из набора субъединиц, многие из которых содержат различные домены (ДНК-связывающие, распознающие гистоновые модификации, взаимодействующие с транскрипционными факторами). Вполне вероятно, что в единственном акте рекрутирования транскрипционного комплекса на хроматин принимают участие несколько подобных доменов, входящих в состав различных субъединиц. Именно набор таких ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий, реализующихся в отдельном акте рекрутирования комплекса к регуляторному элементу, может определять тип функциональной активности комплекса на данном участке хроматина (рис. 5А).

Гораздо детальнее и более однозначно определена роль ковалентных модификаций гистонов в распространении компактизированного хроматина, репрессирующего транскрипцию. Для создания областей компактизированного хроматина и подавления нежелательной транскрипции генов клетка использует различные системы. Можно выделить две активных системы компактизации хроматина, в основе которых лежат белки Pc и HP1, несущие в своем составе хромодомены, способные связывать специфические метилированные остатки гистона H3 [101–103]. Интересно, что в обеих системах компактизации (Pc- и HP1-зависимых) распознавание ковалентных гистоновых модификаций играет роль именно на стадии распространения хроматина внутри хромосомного домена, но не на стадии первичного рекрутирования репрессирующих комплексов к ДНК (осуществляемого специфическими ДНК-связывающими белками) (рис. 5Б). Так, распространение Pc-зависимой репрессии происходит при участии комплексов PRC1 и PRC2, один из которых способен распознавать модификацию H3K27me3 хроматина, а второй, соответственно, ее вносить. Взаимосвязанная работа данных комплексов организует распространение Pc-зависимой репрессии вокруг PRE-элементов, представляющих собой инициаторы Pc-зависимой компактизации [104]. Судя по всему, модификация H3K27me3

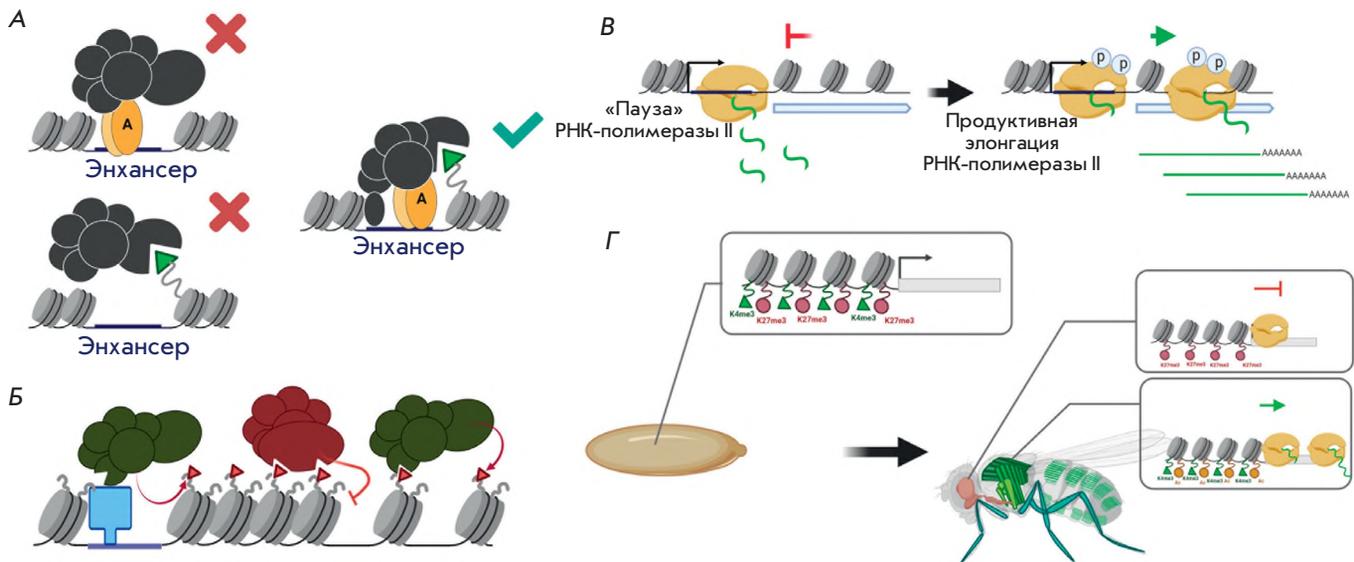


Рис. 5. А – комбинаторный характер рекрутирования транскрипционных корегуляторов. В состав субъединиц корегуляторов часто входят ДНК-связывающие мотивы, домены, распознающие ковалентные модификации гистонов, а также домены ассоциации с ядерными рецепторами и транскрипционными факторами. Целый ряд белковых доменов может играть роль в ассоциации корегулятора с регуляторным элементом ДНК, а также оказывать воздействие на его функциональную активность. Б – общая концепция роли гистоновых модификаций в распространении компактизированного хроматина. Первоначальный рекрутинг комплексов, компактизирующих хроматин, происходит за счет ДНК-связывающих факторов. Ковалентные модификации гистонов важны именно для распространения компактизации хроматина вокруг первоначального сайта связывания комплексов. В – состояние «паузы» РНК-полимеразы II характеризуется наличием на промоторе неактивных генов коротких «абортивных» транскриптов. Г – гены с бивалентными модификациями нуклеосом (активными, H3K4me3, и репрессивными, H3K27me3) в эмбриогенезе характеризуются возможностью дальнейшей репрессии или активации транскрипции в отдельных тканях при их дифференцировке. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приведены ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

необходима не только для распространения Рс-зависимого хроматина вдоль нити ДНК, но и для сохранения соответствующего статуса хроматина после прохождения через него вилки репликации [105]. В механизме распространения перичентромерного гетерохроматина также функционирует положительная петля обратной связи, основанная на распространении ковалентной модификации гистона. В данном случае метилтрансфераза Su(var)3-9 (Suv39H у млекопитающих) модифицирует гистон H3 по положению 9, что приводит к рекрутированию белка гетерохроматина HP1 (который, в свою очередь, привлекает новую порцию метилтрансферазы на компактизируемый участок) [106].

Как мы видим, в процессах активации и репрессии транскрипции распознавание гистоновых модификаций зачастую не является первичным сигналом, определяющим рекрутирование транскрипционных регуляторов. Закономерным развитием идеи «гистонового» кода стала гипотеза о том, что ковалентные модификации гистонов необходимы для обмена транскрипционных комплексов на регуляторных

сайтах [107]. Этому способствовали эксперименты, показавшие существование активного обмена нуклеосом и ассоциированных с ними белков на работающих регуляторных элементах [108].

Роль ковалентных модификаций гистонов в регуляции паузы РНК-полимеразы II

Долгое время привлечение РНК-полимеразы II на промоторы считалось основным механизмом активации транскрипции генов. Позднее стало известно, что многие гены многоклеточных содержат на своих промоторах связанную РНК-полимеразу II, находясь при этом в неактивном состоянии [109]. Транскрипция таких генов активируется путем стимуляции продуктивной элонгации транскрипции РНК-полимеразой II. Такой механизм регуляции транскрипции называется «паузой» РНК-полимеразы II и характеризуется присутствием на промоторе неактивных генов коротких «абортивных» транскриптов (рис. 5В). В настоящее время известно, что этот механизм широко используется организмами в регуляции транскрипции генов, тре-

бующей высокой точности активации в пространстве и времени (например, в определенной ткани или стадии развития) [110]. Распространенность данного механизма сделала его привлекательным для исследований. Одним из интенсивных направлений исследования «паузы» РНК-полимеразы II стал поиск ассоциированных с ней ковалентных гистоновых маркеров, а также с выходом из данного состояния в ходе индукции транскрипции.

Именно в контексте изучения «паузы» РНК-полимеразы II были впервые описаны бивалентные нуклеосомы [111]. Оказалось, что в эмбриональных стволовых клетках мыши «пауза» РНК-полимеразы II присутствует на промоторах, несущих в хроматине модификацию H3K27me3, характерную для репрессии транскрипции. В то же время на промоторах, несущих одновременно и активную модификацию H3K4me3, и репрессивную H3K27me3 (содержащие бивалентные нуклеосомы), РНК-полимераза II отсутствовала [112]. Позже стало понятно, что в эмбриональных стволовых клетках бивалентные модификации присутствуют в основном на промоторах генов, транскрипция которых будет по-разному регулироваться в ходе дифференцировки [113]. В определенных тканях эти гены будут активироваться (на их промоторы будет внесена активная модификация H3K27Ac), в других останутся неактивными (с их промоторов будет удалена модификация H3K4me3, сохранена H3K27me3, а гены переведены в состояние транскрипционной «паузы») (рис. 5Г) [114]. Эта концепция подтверждена различными данными. Установлено, что поддержание промоторов генов в состоянии «паузы», а также перевод промоторов в это состояние осуществляют ферменты, модифицирующие остатки K4 и K27 в гистоне H3. Так, поддержание состояния «паузы» на промоторах генов в эмбриональных стволовых клетках мыши связано с активностью H3K4me3-специфичной деметилазы Lsd1 [115]. Выявлено участие фермента JMJD3, связанного с деметилированием модификации H3K27me3, в контроле элонгации транскрипции в клетках человека [116]. Снижение внутриклеточного уровня данной деметилазы приводило к падению уровня элонгирующей РНК-полимеразы II.

В то же время существует ряд ковалентных модификаций гистонов, появление которых связывают с выходом РНК-полимеразы II из состояния «паузы» путем стимуляции элонгации транскрипции. В первую очередь такими позитивными маркерами являются ацетильные остатки гистонов. Так, обнаружено участие основной ацетилтрансферазы, функционирующей на энхансерах, – белка СВР – в преодолении паузы транскрипции и стимуляции элонгации [117]. Показано, что именно СВР отвечает за ацетилиро-

вание первой нуклеосомы в теле гена по положению H3K27, что необходимо для ее преодоления элонгирующим комплексом РНК-полимеразы II. Другая ацетильная модификация гистонов, H3K9Ac, связана с выходом РНК-полимеразы II из «паузы», способствуя рекрутированию комплекса SEC (Super elongation complex), содержащего ряд факторов, необходимых для элонгации транскрипции [118]. Оказалось, что снижение уровня H3K9Ac препятствует элонгации и приводит к росту индекса «паузы» (увеличения соотношения между уровнем РНК-полимеразы II на промоторе и в теле гена).

Недавно наша группа исследовала кинетику привлечения модификаторов хроматина и появления ковалентных гистоновых модификаций в первые минуты после активации транскрипции генов развития, пребывающих в состоянии «паузы» транскрипции в клетках дрозофилы [119]. Нами исследовано рекрутирование двух десятков транскрипционных комплексов, что позволило обнаружить неожиданный регуляторный эффект. Мы практически не наблюдали роста уровня связывания модифицирующих хроматин комплексов с промоторами генов в ходе их активации. Но при этом обнаружили значительное повышение уровня модификаций хроматина, вносимых этими комплексами. Данный эффект был назван «паузой» коактиваторов транскрипции (рис. 6А). По-видимому, в ходе формирования транскрипционной «паузы» на неактивный промотор рекрутируется не только РНК-полимераза II, но и многие комплексы, модифицирующие хроматин. Сигнал, индуцирующий транскрипцию, не приводит к дальнейшему увеличению уровня связывания данных комплексов, но стимулирует их функциональную активность, что приводит к росту уровня вносимых ими модификаций. Проверить распространенность эффекта «паузы» коактиваторов в геноме дрозофилы мы планируем в дальнейших исследованиях.

Ковалентные модификации гистонов – на самом деле «побочные цели»?

Популярность гипотезы «гистонового кода» привела к тому, что ковалентные модификации гистонов долгое время привлекали внимание исследователей. В частности, описано множество транскрипционных регуляторов (в том числе и мультисубъединичных комплексов), основной молекулярной функцией которых была признана ковалентная модификация гистоновых белков. Позднее оказалось, что ряд модификаций вносит достаточно скромный функциональный вклад в регуляцию транскрипции, а ферментативное действие вносящих их регуляторов направлено на другую негистоновую белковую мишень, имеющую большее значение.

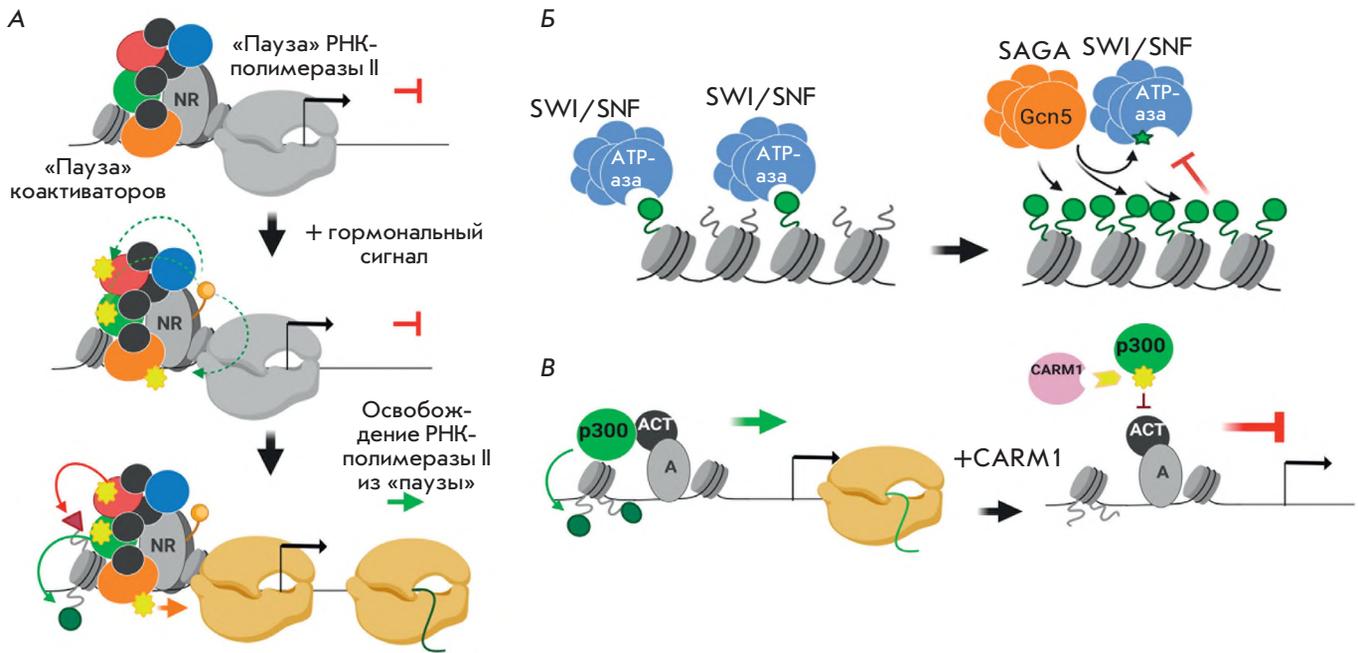


Рис. 6. А – промоторы генов, регулируемых по механизму «паузы» РНК-полимеразы II, содержат в их неактивном состоянии не только связанную с ними РНК-полимеразу II, но и коактиваторные комплексы. Транскрипция таких генов активируется не за счет рекрутирования корегуляторных комплексов, а за счет изменения их функциональной активности. Б – гистон-ацетилазный комплекс SAGA ацетилюет АТФ-азную субъединицу комплекса SWI/SNF, регулируя силу ее связывания с хроматином. В – аргинин-метилтрансфераза CARM1 метилирует ацетилазную субъединицу комплекса SWI/SNF, снижая активность SWI/SNF и нарушая ее способность связывать активаторы транскрипции. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приведены ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

Яркий пример такого регулятора – модификатора хроматина – комплекс SAGA, способный ацетилировать остатки лизина в молекулах гистонов H3 и H4. Долгое время полагали, что ацетильные группы, вносимые этим комплексом, можно рассматривать как специфические метки, которые аккуратно «читаются» другими транскрипционными регуляторами при помощи белковых доменов-«ридеров». В частности, предполагалось, что метки, вносимые комплексом SAGA, распознаются бромодоменом, входящим в состав комплекса SWI/SNF, который получает способность ремоделировать именно ацетилированные гистоны [120]. Эта гипотеза хорошо соответствовала факту совместного присутствия комплексов SAGA и SWI/SNF на сайтах в геноме различных организмов [10, 121]. Со временем стало понятно, что ацетильные остатки гистонов вряд ли служат специфическим маркером для привлечения каких-то определенных комплексов. Дело в том, что функциональный эффект на транскрипцию ацетильных остатков хроматина связан с общим количеством остатков, но почти не зависит от их качественного состава [122, 123]. Более глубокие исследования привели к описанию дополнительных мишеней ацетилирования посредством комплекса SAGA. В частности,

оказалось, что SAGA ацетилюет АТФ-азную субъединицу комплекса SWI/SNF, регулируя тем самым силу ее связывания с хроматином (рис. 6Б) [124].

Обнаружены дополнительные белковые мишени и у других модификаторов хроматина. Оказалось, что аргинин-метилтрансфераза CARM1, исходно описанная как специфический модификатор Arg17 гистона H3, на самом деле метилирует остатки Arg во многих транскрипционных регуляторах, модулируя их функции [125, 126]. В частности, мишенями CARM1 оказались факторы сплайсинга, метилируя которые данный белок провоцирует пропуск экзонов в мРНК [35]. Другая мишень метилирования CARM1 – ацетилазная субъединица комплекса SWI/SNF – один из ключевых ферментов, функционирующих на энхансерах. Метилирование SWI/SNF, осуществляемое CARM1, снижает активность этой ацетилазной субъединицы, а также нарушает ее способность связывать активаторы транскрипции (рис. 6В) [36, 127].

Таким образом, более глубокое исследование транскрипционных регуляторов, исходно охарактеризованных как модификаторы хроматина, приводит к выявлению их дополнительных ферментативных мишеней. Вполне вероятно, что дальнейшее изучение этих дополнительных мишеней может показать

их более высокую функциональную значимость по сравнению с мишенями-гистонами, которые могут быть лишь «побочными целями» ряда модификаторов. Это предположение подкрепляется результатами некоторых мутационных исследований, направленных на выявление функциональной значимости отдельных гистоновых модификаций. Так, мутации отдельных модификаторов хроматина сильнее действуют на регуляцию транскрипции, чем мутации их сайтов-мишеней в гистонах, что указывает на существование каких-то более значимых мишеней-регуляторов [128, 129]. Вполне вероятно, что будут найдены и другие модификации гистонов, которые являются лишь побочным продуктом действия модификатора хроматина на пути к достижению им своей основной регуляторной цели.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ И НЕРЕШЕННЫЕ ВОПРОСЫ

Растущий объем информации о механизмах регуляции транскрипции и активности корегуляторов не всегда приводит к разрешению вопросов, которые сформировались ранее. Ниже мы приведем несколько таких проблем, точного решения которых пока не найдено, несмотря на имеющийся в настоящее время богатейший экспериментальный арсенал.

Рекрутирование транскрипционного регулятора на хроматин: в комплексе с ДНК-связывающим белком или последовательно

Специфичность действия корегулятора на транскрипцию определяется ДНК-связывающими белками. Именно они опосредуют связывание корегуляторов с последовательностями энхансеров и промоторов. Механизм взаимодействия корегуляторов с ДНК на сегодняшний день остается непонятным. Происходит ли последовательное связывание ДНК-связывающего белка с регуляторным элементом с последующим рекрутированием корегуляторного комплекса или же происходит связывание ранее сформированного между ними комплекса (рис. 7А). В контексте исследований динамики связывания белков с хроматином концепция последовательного рекрутинга выглядит сомнительно. Показано, что ассоциация любых белков с ДНК не может превышать нескольких минут [107]. Поэтому последовательная ассоциация белков на регуляторном элементе выглядит маловероятной – для функционального действия остается совсем маленькое временное окно. Гипотеза одновременного рекрутирования корегуляторов и ДНК-связывающих белков высказывалась неоднократно и достаточно давно, однако исходная концепция последовательного связывания до сих пор имеет большее распространение [67]. При этом

недавно предположили, что именно комплексы транскрипционных факторов (ядерных рецепторов) с корегуляторами, ремоделирующими хроматин, способны взаимодействовать с хроматином, выступая в роли факторов-«пионеров» [130]. Кроме того, показано, что нокаут АТФ-азных субъединиц корегуляторов SWI/SNF и ISWI значительно нарушает связывание транскрипционных факторов в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши (что невозможно в концепции последовательного рекрутирования) [131]. Все эти данные значительно укрепляют модель совместного рекрутирования корегуляторов и ДНК-связывающих факторов. Серьезным доводом в пользу этой концепции стало бы биохимическое выделение транскрипционных факторов в комплексе с корегуляторами. Однако обычно связь между транскрипционным фактором и корегулятором является хотя и специфическим, но слабым взаимодействием, которое легко теряется при биохимической очистке. Будем надеяться, что разработанные за последнее время методики исследования слабых белок-белковых взаимодействий (например, *in vivo* биотинилирование белков) помогут прояснить механизмы взаимодействия корегуляторов с хроматином.

Изменение субъединичного состава белковых комплексов в ходе транскрипции: трансформация комплекса или рекрутирование нового

Известно, что многие корегуляторные комплексы принимают участие в различных этапах транскрипции генов. Зачастую при изучении подобных комплексов основное внимание направлено на распределение и свойства ферментативных субъединиц комплекса, тогда как поведение остальных субъединиц остается неисследованным. Тем не менее показано, что состав ряда транскрипционных комплексов не постоянен, а может меняться в зависимости от этапа транскрипции (рис. 7Б). Так, известно, что транскрипционный корегулятор SAGA обладает ацетилтрансферазной и деубиквитиновой активностью по отношению к гистонам. Обе эти активности необходимы для функционирования SAGA на промоторе гена, где он способствует инициации транскрипции [132, 133]. В то же время известно, что компонент деубиквитиновой модуля комплекса SAGA, белок SGF11, также ассоциирован с кепом новосинтезированной мРНК, где он принимает участие в ее экспорте из ядра в цитоплазму [134]. Интерес вызывает возможность перехода субъединицы SAGA в комплекс AMEX в ходе транскрипции. Происходит ли независимое рекрутирование двух отдельно существующих комплексов к активному гену или имеет место субъединичная трансформация комплекса SAGA, исходно рекрутированного к промотору, в ходе перехода комплекса

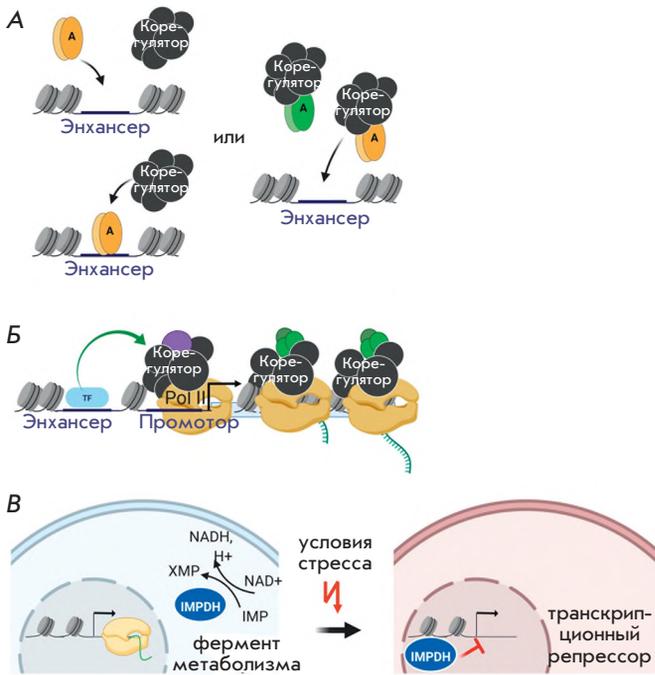


Рис. 7. А – рекрутирование транскрипционного регулятора на хроматин: в комплексе с ДНК-связывающим белком или последовательно. Б – изменение субъединичного состава белковых комплексов в ходе транскрипции: трансформация того же комплекса или рекрутирование нового. В – инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH), фермент биосинтеза пуринов, работающий в цитоплазме клетки, в стрессовых условиях способен проникать в ядро и регулировать транскрипцию генов. Более детальное описание рисунков приведено в тексте. Там же приведены ссылки на работы, послужившие основой для формирования молекулярных моделей процессов, ассоциированных с транскрипцией. Все модели созданы при помощи приложения BioRender.com

РНК-полимеразы II в тело гена. Другой хорошо известный пример изменения субъединичного состава корегулятора в процессе транскрипции – комплекс Mediator. Основная роль этого огромного многосубъединичного комплекса состоит в координации рекрутирования РНК-полимеразы к промотору и инициации транскрипции [135]. Однако в состав Mediator входит отдельный четырехсубъединичный модуль CDK8, обладающий киназной активностью и выполняющий ряд дополнительных функций. Интересно, что взаимодействие коровой части Mediator с РНК-полимеразой исключает присутствие в нем модуля CDK8. При этом широко известна роль модуля CDK8 в стимуляции элонгации, т.е. в поздних этапах активации транскрипции [136]. Остается неясным, каким образом модуль CDK8 рекрутируется на гены для участия в стимуляции элонгации. Является ли этот путь альтернативой привлечению Mediator или имеет ме-

сто структурная трансформация полного комплекса Mediator в ходе транскрипционного цикла?

Два приведенных примера лишь иллюстрируют наши проблемы в изучении сложных мультисубъединичных комплексов. Получено множество косвенных подтверждений изменения состава и свойств корегуляторных комплексов в ходе транскрипции. Однако прямых экспериментальных доказательств пока еще нет, поскольку отсутствуют методики, необходимые для проведения таких исследований.

Влияние нетранскрипционных комплексов на транскрипцию: иерархия функций, определение ведущей функции

Исходной стратегией при изучении функций белков и белковых комплексов было углубленное исследование одной функции, по которой данный белок был охарактеризован. Позднее популярным стало другое направление, в котором старались найти и описать как можно больше новых функций единственного белка, в том числе в достаточно далеких друг от друга молекулярных процессах. Так, например, была обнаружена способность ряда метаболических ферментов, в норме работающих в цитоплазме клетки, в стрессовых условиях проникать внутрь клеточного ядра и управлять транскрипцией генов, выступая в роли транскрипционных регуляторов (рис. 7В) [137]. Другой впечатляющий пример – комплекс ORC, отвечающий за распознавание ориджинов репликации и инициацию формирования пререпликативного комплекса на ДНК [138]. Совсем недавно показано, что этот комплекс целиком вовлечен в процессинг мРНК и ее транспорт из ядра в цитоплазму. Оказалось, что многие субъединицы ORC взаимодействуют *in vivo* с факторами процессинга, а их нокаун приводит к нарушению транспорта мРНК [139, 140].

В столь сложных случаях многофункциональности белков и белковых комплексов в какой-то момент встает проблема переосмысления имеющихся данных и устоявшихся взглядов на их ведущие функции. Вполне может оказаться, что первоначально описанная функциональная роль многих регуляторов может быть лишь косвенным результатом выполнения ими своей ведущей функции, идентифицированной гораздо позднее. Учитывая экспоненциальный рост количества экспериментальных данных, вполне вероятно, что нам придется пройти через этапы переосмысления иерархии функций большинства известных белков. Нам кажется, что хорошим подспорьем в данном случае могут стать эволюционные исследования. Получение информации о функциональных свойствах белков у родственных, немодельных организмов, может помочь проследить историю возникновения новых функций и составить иерархию их значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как мы видим, организм использует корегуляторные комплексы в качестве одного из способов контроля транскрипции определенного набора генов. Таким образом, корегуляторные транскрипционные комплексы вполне могут быть перспективными терапевтически мишенями при разработке лекарственных средств, направленных на изменение уровня транскрипции специфического набора генов. Уже в настоящее время ряд подобных лекарственных препаратов проходят клинические испытания. В настоящее время перспективными мишенями-корегуляторами транскрипции для разработки низкомолекулярных ингибиторов

считаются ферментативная субъединица EZH2 комплекса PRC2, корегулятор элонгации транскрипции Brd4, а также различные гистондеацетилазы HDAC [141–143]. Разработка и тестирование лекарственных препаратов, направленных на модификацию функциональных свойств данных белков, начались совсем недавно. Безусловно, семейство транскрипционных регуляторов все еще скрывает в себе множество других перспективных белков-мишеней. ●

*Данная работа поддержана грантом
Российского научного фонда № 18-14-00219
(рук. Н.Е. Воробьева).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E. // Cell Biosci. 2016. V. 6. P. 15.
- Rybakova K.N., Bruggeman F.J., Tomaszewska A., Moné M.J., Carlberg C., Westerhoff H.V. // PLoS Comput. Biol. 2015. V. 11. № 4. P. e1004236.
- Wang Y., Ni T., Wang W., Liu F. // Biol. Rev. 2019. V. 94. № 1. P. 248–258.
- Azpeitia E., Wagner A. // Front. Mol. Biosci. 2020. V. 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198700/>.
- Harada B.T., Hwang W.L., Deindl S., Chatterjee N., Bartholomew B., Zhuang X. // eLife. 2016. V. 5. P. e10051.
- Yague-Sanz C., Vázquez E., Sánchez M., Antequera F., Hermand D. // Curr. Genet. 2017. V. 63. № 2. P. 187–193.
- Rawal Y., Chereji R.V., Qiu H., Ananthkrishnan S., Govind C.K., Clark D.J., Hinnebusch A.G. // Genes Dev. 2018. V. 32. № 9–10. P. 695–710.
- Dechassa M.L., Sabri A., Pondugula S., Kassabov S.R., Chatterjee N., Kladde M.P., Bartholomew B. // Mol. Cell. 2010. V. 38. № 4. P. 590–602.
- Mazina M.I., Vorob'eva N.E., Krasnov A.N. // Tsitologiya. 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
- 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.
- Chatterjee N., Sinha D., Lemma-Dechassa M., Tan S., Shogren-Knaak M.A., Bartholomew B. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 19. P. 8378–8391.
- Mitra D., Parnell E.J., Landon J.W., Yu Y., Stillman D.J. // Mol. Cell. Biol. 2006. V. 26. № 11. P. 4095–4110.
- Sullivan E.K., Weirich C.S., Guyon J.R., Sif S., Kingston R.E. // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. № 17. P. 5826–5837.
- Yudkovsky N., Logie C., Hahn S., Peterson C.L. // Genes Dev. 1999. V. 13. № 18. P. 2369–2374.
- Zhang B., Chambers K.J., Faller D.V., Wang S. // Oncogene. 2007. V. 26. № 50. P. 7153–7157.
- McKnight J.N., Jenkins K.R., Nodelman I.M., Escobar T., Bowman G.D. // Mol. Cell. Biol. 2011. V. 31. № 23. P. 4746–4759.
- Collins N., Poot R.A., Kukimoto I., Garcia-Jiménez C., Dellaire G., Varga-Weisz P.D. // Nat. Genet. 2002. V. 32. № 4. P. 627–632.
- Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J., Kauer M., Tackett A.J., Chait B.T., Badenhorst P., et al. // Nature. 2006. V. 442. № 7098. P. 86–90.
- Eberharter A., Ferrari S., Längst G., Straub T., Imhof A., Varga-Weisz P., Wilm M., Becker P.B. // EMBO J. 2001. V. 20. № 14. P. 3781–3788.
- Badenhorst P., Xiao H., Cherbas L., Kwon S.Y., Voas M., Rebay I., Cherbas P., Wu C. // Genes Dev. 2005. V. 19. № 21. P. 2540–2545.
- Song H., Spichiger-Haeusermann C., Basler K. // EMBO Rep. 2009. V. 10. № 10. P. 1140–1146.
- Siggens L., Cordeddu L., Rönnerblad M., Lennartsson A., Ekwall K. // Epigenetics Chromatin. 2015. V. 8. № 1. P. 4.
- Smolle M., Workman J.L. // Biochim. Biophys. Acta BBA – Gene Regul. Mech. 2013. V. 1829. № 1. P. 84–97.
- Bracken A.P., Brien G.L., Verrijzer C.P. // Genes Dev. 2019. V. 33. № 15–16. P. 936–959.
- Krietenstein N., Wal M., Watanabe S., Park B., Peterson C.L., Pugh B.F., Korber P. // Cell. 2016. V. 167. № 3. P. 709–721.e12.
- Udugama M., Sabri A., Bartholomew B. // Mol. Cell. Biol. 2011. V. 31. № 4. P. 662–673.
- Willhoft O., Wigley D.B. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2020. V. 61. P. 50–58.
- Poli J., Gerhold C.-B., Tosi A., Hustedt N., Seeber A., Sack R., Herzog F., Pasero P., Shimada K., Hopfner K.-P., et al. // Genes Dev. 2016. V. 30. № 3. P. 337–354.
- Lafon A., Taranum S., Pietrocola F., Dingli F., Loew D., Brahma S., Bartholomew B., Papamichos-Chronakis M. // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 5. P. 784–796.
- Hallson G., Hollebakk R.E., Li T., Syrzycka M., Kim I., Cotsworth S., Fitzpatrick K.A., Sinclair D.A.R., Honda B.M. // Genetics. 2012. V. 190. № 1. P. 91–100.
- Bae H.J., Dubarry M., Jeon J., Soares L.M., Dargemont C., Kim J., Geli V., Buratowski S. // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 2181.
- Tie F., Banerjee R., Saiakhova A.R., Howard B., Monteith K.E., Scacheri P.C., Cosgrove M.S., Harte P.J. // Dev. Camb. Engl. 2014. V. 141. № 5. P. 1129–1139.
- Carbonell A., Mazo A., Serras F., Corominas M. // Mol. Biol. Cell. 2013. V. 24. № 3. P. 361–372.
- Schurter B.T., Koh S.S., Chen D., Bunick G.J., Harp J.M., Hanson B.L., Henschen-Edman A., Mackay D.R., Stallcup M.R., Aswad D.W. // Biochemistry. 2001. V. 40. № 19. P. 5747–5756.
- Cheng D., Côté J., Shaaban S., Bedford M.T. // Mol. Cell. 2007. V. 25. № 1. P. 71–83.
- Bao J., Rousseaux S., Shen J., Lin K., Lu Y., Bedford M.T. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № 9. P. 4327–4343.
- Xu W., Cho H., Kadam S., Banayo E.M., Anderson S., Yates J.R., Emerson B.M., Evans R.M. // Genes Dev. 2004. V. 18. № 2. P. 144–156.
- Strahl B.D., Briggs S.D., Brame C.J., Caldwell J.A., Koh S.S., Ma H., Cook R.G., Shabanowitz J., Hunt D.F., Stallcup M.R., et al. // Curr. Biol. 2001. V. 11. № 12. P. 996–1000.

39. Kwak Y.T., Guo J., Prajapati S., Park K.-J., Surabhi R.M., Miller B., Gehrig P., Gaynor R.B. // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. № 4. P. 1055–1066.
40. Zhang C., Robinson B.S., Xu W., Yang L., Yao B., Zhao H., Byun P.K., Jin P., Veraksa A., Moberg K.H. // *Dev. Cell.* 2015. V. 34. № 2. P. 168–180.
41. Le Romancer M., Treilleux I., Leconte N., Robin-Lespinasse Y., Sentis S., Bouchekioua-Bouzaghrou K., Goddard S., Gobert-Gosse S., Corbo L. // *Mol. Cell.* 2008. V. 31. № 2. P. 212–221.
42. Tang J., Kao P.N., Herschman H.R. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 26. P. 19866–19876.
43. Sun X.-J., Wei J., Wu X.-Y., Hu M., Wang L., Wang H.-H., Zhang Q.-H., Chen S.-J., Huang Q.-H., Chen Z. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 42. P. 35261–35271.
44. Chen K., Liu J., Liu S., Xia M., Zhang X., Han D., Jiang Y., Wang C., Cao X. // *Cell.* 2017. V. 170. № 3. P. 492–506.e14.
45. Kizer K.O., Phatnani H.P., Shibata Y., Hall H., Greenleaf A.L., Strahl B.D. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 8. P. 3305–3316.
46. Govind C.K., Qiu H., Ginsburg D.S., Ruan C., Hofmeyer K., Hu C., Swaminathan V., Workman J.L., Li B., Hinnebusch A.G. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 2. P. 234–246.
47. Bonnet J., Wang C.-Y., Baptista T., Vincent S.D., Hsiao W.-C., Stierle M., Kao C.-F., Tora L., Devys D. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 18. P. 1999–2012.
48. Riss A., Scheer E., Joint M., Trowitzsch S., Berger I., Tora L. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 48. P. 28997–29009.
49. Weake V.M., Workman J.L. // *Trends Cell Biol.* 2012. V. 22. № 4. P. 177–184.
50. Jin Q., Yu L.-R., Wang L., Zhang Z., Kasper L.H., Lee J.-E., Wang C., Brindle P.K., Dent S.Y.R., Ge K. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 2. P. 249–262.
51. Tropberger P., Pott S., Keller C., Kamieniarz-Gdula K., Caron M., Richter F., Li G., Mittler G., Liu E.T., Bühler M., et al. // *Cell.* 2013. V. 152. № 4. P. 859–872.
52. Han Y., Jin Y.-H., Kim Y.-J., Kang B.-Y., Choi H.-J., Kim D.-W., Yeo C.-Y., Lee K.-Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. № 4. P. 576–580.
53. Bedford D.C., Kasper L.H., Fukuyama T., Brindle P.K. // *Epigenetics.* 2010. V. 5. № 1. P. 9–15.
54. Wang F., Marshall C.B., Ikura M. // *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 2013. V. 70. № 21. P. 3989–4008.
55. Kim J., Hake S.B., Roeder R.G. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. № 5. P. 759–770.
56. Sun Z.-W., Allis C.D. // *Nature.* 2002. V. 418. № 6893. P. 104–108.
57. Van Oss S.B., Shirra M.K., Bataille A.R., Wier A.D., Yen K., Vinayachandran V., Byeon I.-J.L., Cucinotta C.E., Héroux A., Jeon J., et al. // *Mol. Cell.* 2016. V. 64. № 4. P. 815–825.
58. Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R., Peterson C.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. № 7. P. 407–422.
59. Mazina M.Y., Vorobyeva N.E. // *Rus. J. Genet.* 2016. V. 52. № 5. P. 463–472.
60. Zaret K.S., Carroll J.S. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 21. P. 2227–2241.
61. Cirillo L.A., Lin F.R., Cuesta I., Friedman D., Jarnik M., Zaret K.S. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. № 2. P. 279–289.
62. Updike D.L., Mango S.E. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. № 9. P. e161.
63. Lupien M., Eeckhoute J., Meyer C.A., Wang Q., Zhang Y., Li W., Carroll J.S., Liu X.S., Brown M. // *Cell.* 2008. V. 132. № 6. P. 958–970.
64. Hurtado A., Holmes K.A., Ross-Innes C.S., Schmidt D., Carroll J.S. // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 1. P. 27–33.
65. Kong S.L., Li G., Loh S.L., Sung W.-K., Liu E.T. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 526.
66. Belandia B., Orford R.L., Hurst H.C., Parker M.G. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 15. P. 4094–4103.
67. Vicent G.P., Nacht A.S., Font-Mateu J., Castellano G., Gaveglia L., Ballaré C., Beato M. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 8. P. 845–862.
68. Tang L., Nogales E., Ciferri C. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2010. V. 102. № 2. P. 122–128.
69. Torigoe S.E., Urwin D.L., Ishii H., Smith D.E., Kadonaga J.T. // *Mol. Cell.* 2011. V. 43. № 4. P. 638–648.
70. Li M., Hada A., Sen P., Olufemi L., Hall M.A., Smith B.Y., Forth S., McKnight J.N., Patel A., Bowman G.D., et al. // *eLife.* 2015. V. 4. P. e06249.
71. Manning B.J., Peterson C.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 50. P. 17827–17832.
72. Rege M., Feldman J.L., Adkins N.L., Peterson C.L. // *bioRxiv.* 2020. P. 2020.03.24.006205.
73. Kia S.K., Gorski M.M., Giannakopoulos S., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 10. P. 3457–3464.
74. Kim K.H., Kim W., Howard T.P., Vazquez F., Tsherniak A., Wu J.N., Wang W., Haswell J.R., Walensky L.D., Hahn W.C., et al. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. № 12. P. 1491–1496.
75. Kadoch C., Williams R.T., Calarco J.P., Miller E.L., Weber C.M., Braun S.M.G., Pulice J.L., Chory E.J., Crabtree G.R. // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 2. P. 213–222.
76. Längst G., Manelyte L. // *Genes.* 2015. V. 6. № 2. P. 299–324.
77. Kadoch C., Crabtree G.R. // *Sci. Adv.* 2015. V. 1. № 5. P. e1500447.
78. Moshkin Y.M., Mohrmann L., van Ijcken W.F.J., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 2. P. 651–661.
79. 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.
80. Emelyanov A.V., Vershilova E., Ignatyeva M.A., Pokrovsky D.K., Lu X., Konev A.Y., Fyodorov D.V. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 6. P. 603–614.
81. Torrado M., Low J.K.K., Silva A.P.G., Schmidberger J.W., Sana M., Sharifi Tabar M., Isilak M.E., Winning C.S., Kwong C., Bedward M.J., et al. // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 24. P. 4216–4232.
82. Zhang W., Aubert A., Gomez de Segura J.M., Karupphasamy M., Basu S., Murthy A.S., Diamante A., Drury T.A., Balmer J., Cramard J., et al. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 14. P. 2931–2942.
83. Bornelöv S., Reynolds N., Xenophontos M., Gharbi S., Johnstone E., Floyd R., Ralser M., Signolet J., Loos R., Dietmann S., et al. // *Mol. Cell.* 2018. V. 71. № 1. P. 56–72.e4.
84. Kwok R.S., Li Y.H., Lei A.J., Ederly I., Chiu J.C. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 7. P. e1005307.
85. Jordán-Pla A., Yu S., Waldholm J., Källman T., Östlund Farrants A.-K., Visa N. // *BMC Genomics.* 2018. V. 19. № 1. P. 367.
86. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Kuzmina J.L., Kopantseva M.R., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 14. P. 2152–2156.
87. Moshkin Y.M., Chalkley G.E., Kan T.W., Reddy B.A., Ozgur Z., van Ijcken W.F.J., Dekkers D.H.W., Demmers J.A., Travers A.A., Verrijzer C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 32. № 3. P. 675–688.
88. 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 Georget. Tex.* 2011. V. 10. № 11. P. 1821–1827.
89. Panov V.V., Kuzmina J.L., Doronin S.A., Kopantseva M.R., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Vorobyeva N.E., Shidlovskii Y.V. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 6. P. 2445–2453.
90. Jenuwein T., Allis C.D. // *Science.* 2001. V. 293. № 5532. P. 1074–1080.
91. Howe F.S., Fischl H., Murray S.C., Mellor J. // *BioEssays.* 2017. V. 39. № 1. P. e201600095.

92. Musselman C.A., Lalonde M.-E., Côté J., Kutateladze T.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 12. P. 1218–1227.
93. Yun M., Wu J., Workman J.L., Li B. // *Cell Res.* 2011. V. 21. № 4. P. 564–578.
94. Peña P.V., Davrazou F., Shi X., Walter K.L., Verkhusa V.V., Gozani O., Zhao R., Kutateladze T.G. // *Nature.* 2006. V. 442. № 7098. P. 100–103.
95. Shi X., Hong T., Walter K.L., Ewalt M., Michishita E., Hung T., Carney D., Peña P., Lan F., Kaadige M.R., et al. // *Nature.* 2006. V. 442. № 7098. P. 96–99.
96. Sims R.J., Chen C.-F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 51. P. 41789–41792.
97. Morettini S., Tribus M., Zeilner A., Sebald J., Campo-Fernandez B., Scheran G., Wörle H., Podhraski V., Fyodorov D.V., Lusser A. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 8. P. 3103–3115.
98. Lauberth S.M., Nakayama T., Wu X., Ferris A.L., Tang Z., Hughes S.H., Roeder R.G. // *Cell.* 2013. V. 152. № 5. P. 1021–1036.
99. Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D., Patel D.J. // *Nature.* 2006. V. 442. № 7098. P. 91–95.
100. Li Y., Schulz V.P., Deng C., Li G., Shen Y., Tusi B.K., Ma G., Stees J., Qiu Y., Steiner L.A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 15. P. 7173–7188.
101. Beisel C., Paro R. // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 2. P. 123–135.
102. Kassis J.A., Brown J.L. // *Advances in Genetics* / Eds Friedmann T., Dunlap J.C., Goodwin S.F. Acad. Press, 2013. V. 81. P. 83–118. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124076778000038>.
103. Saksouk N., Simboeck E., Déjardin J. // *Epigenetics Chromatin.* 2015. V. 8. № 1. P. 3.
104. Kahn T.G., Dorafshan E., Schultheis D., Zare A., Stenberg P., Reim I., Pirrotta V., Schwartz Y.B. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 21. P. 10132–10149.
105. Francis N.J., Follmer N.E., Simon M.D., Aghia G., Butler J.D. // *Cell.* 2009. V. 137. № 1. P. 110–122.
106. Müller-Ott K., Erdel F., Matveeva A., Mallm J.-P., Rademacher A., Hahn M., Bauer C., Zhang Q., Kaltofen S., Schotta G., et al. // *Mol. Syst. Biol.* 2014. V. 10. № 8. P. 746.
107. Coulon A., Chow C.C., Singer R.H., Larson D.R. // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 8. P. 572–584.
108. Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S. // *Science.* 2010. V. 328. № 5982. P. 1161–1164.
109. Adelman K., Lis J.T. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 10. P. 720–731.
110. Gaertner B., Johnston J., Chen K., Wallaschek N., Paulson A., Garruss A.S., Gaudenz K., De Kumar B., Krumlauf R., Zeitlinger J. // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 6. P. 1670–1683.
111. Min I.M., Waterfall J.J., Core L.J., Munroe R.J., Schimenti J., Lis J.T. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 7. P. 742–754.
112. Vastenhouw N.L., Schier A.F. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. № 3. P. 374–386.
113. Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2020. V. 89. P. 235–253.
114. Atlasi Y., Stunnenberg H.G. // *Nat. Rev. Genet.* 2017. V. 18. № 11. P. 643–658.
115. Kim H.J., Kim T., Oldfield A.J., Yang P. // *bioRxiv.* 2020. P. 2020.10.13.338103.
116. Chen S., Ma J., Wu F., Xiong L., Ma H., Xu W., Lv R., Li X., Villen J., Gygi S.P., et al. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 12. P. 1364–1375.
117. Boija A., Mahat D.B., Zare A., Holmqvist P.-H., Philip P., Meyers D.J., Cole P.A., Lis J.T., Stenberg P., Mannervik M. // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. № 3. P. 491–503.e5.
118. Gates L.A., Shi J., Rohira A.D., Feng Q., Zhu B., Bedford M.T., Sagum C.A., Jung S.Y., Qin J., Tsai M.-J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 35. P. 14456–14472.
119. Mazina M.Yu., Kovalenko E.V., Derevyanko P.K., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gene Regul. Mech.* 2018. V. 1861. № 2. P. 178–189.
120. Chandy M., Gutiérrez J.L., Prochasson P., Workman J.L. // *Eukaryot. Cell.* 2006. V. 5. № 10. P. 1738–1747.
121. Qiu H., Chereji R.V., Hu C., Cole H.A., Rawal Y., Clark D.J., Hinnebusch A.G. // *Genome Res.* 2016. V. 26. № 2. P. 211–225.
122. Dion M.F., Altschuler S.J., Wu L.F., Rando O.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 15. P. 5501–5506.
123. Shahbazian M.D., Grunstein M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76. № 1. P. 75–100.
124. Kim J.-H., Saraf A., Florens L., Washburn M., Workman J.L. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 24. P. 2766–2771.
125. Daujat S., Bauer U.-M., Shah V., Turner B., Berger S., Kouzarides T. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 24. P. 2090–2097.
126. Ma H., Baumann C.T., Li H., Strahl B.D., Rice R., Jelinek M.A., Aswad D.W., Allis C.D., Hager G.L., Stallcup M.R. // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 24. P. 1981–1985.
127. Chevillard-Briet M., Trouche D., Vandel L. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 20. P. 5457–5466.
128. Dorafshan E., Kahn T.G., Glotov A., Savitsky M., Walther M., Reuter G., Schwartz Y.B. // *EMBO Rep.* 2019. V. 20. № 4. P. e46762.
129. Hödl M., Basler K. // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. № 23. P. 2253–2257.
130. Swinstead E.E., Paakinaho V., Presman D.M., Hager G.L. // *BioEssays.* 2016. V. 38. № 11. P. 1150–1157.
131. Barisic D., Stadler M.B., Iurlaro M., Schübeler D. // *Nature.* 2019. V. 569. № 7754. P. 136–140.
132. Baptista T., Grünberg 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.e5.
133. Chandrasekharan M.B., Huang F., Sun Z.-W. // *Epigenetics.* 2010. V. 5. № 6. P. 460–468.
134. 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.
135. Allen B.L., Taatjes D.J. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 3. P. 155–166.
136. Fant C.B., Taatjes D.J. // *Transcription.* 2018. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21541264.2018.1556915>.
137. van der Knaap J.A., Verrijzer C.P. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 21. P. 2345–2369.
138. Hoggard T., Fox C.A. // *The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes* / Ed. Kaplan D.L. Cham. Springer Internat. Publ. 2016. P. 159–188. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24696-3_9.
139. 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.
140. Popova V.V., Brechalov A.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. // *Nucleus.* 2018. V. 9. № 1. P. 460–473.
141. Fioravanti R., Stazi G., Zwergel C., Valente S., Mai A. // *Chem. Rec.* 2018. V. 18. № 12. P. 1818–1832.
142. Laubach J.P., San-Miguel J.F., Hungria V., Hou J., Moreau P., Lonial S., Lee J.H., Einsele H., Alsina M., Richardson P.G. // *Expert Rev. Hematol.* 2017. V. 10. № 3. P. 229–237.
143. Waring M.J., Chen H., Rabow A.A., Walker G., Bobby R., Boiko S., Bradbury R.H., Callis R., Clark E., Dale I., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2016. V. 12. № 12. P. 1097–1104.

УДК 577.21

СТСФ как пример ДНК-связывающих транскрипционных факторов, содержащих кластеры цинковых пальцев С2Н2-типа

О. Г. Максименко^{1,2*}, Д. В. Фурсенко¹, Е. В. Белова^{1,2}, П. Г. Георгиев^{1*}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: maksog@mail.ru; georgiev_p@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2020

Принята к печати 12.11.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11206

РЕФЕРАТ В клетках млекопитающих большая часть границ топологически ассоциированных доменов и всех хорошо изученных инсуляторов обогащена сайтами связывания белка СТСФ. Согласно экспериментальным данным, СТСФ является ключевым фактором в организации архитектуры хромосом млекопитающих. Присутствие в центральной части СТСФ кластера из 11 доменов цинковых пальцев С2Н2-типа, пять из которых специфически связываются с протяженной, консервативной у большей части животных последовательностью ДНК, определяет основную часть функциональных свойств СТСФ как архитектурного белка. Класс транскрипционных факторов, содержащих кластер цинковых пальцев С2Н2-типа из пяти и более доменов (С2Н2-белки), широко представлен во всех группах животных. В настоящее время функции подавляющей части С2Н2-белков остаются неизвестными. На примере СТСФ позвоночных и нескольких С2Н2-белков дрозофилы в обзоре рассмотрено строение и вероятные архитектурные функции этих белков. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** цинковые пальцы С2Н2-типа, архитектурные белки, регуляция транскрипции, инсуляторы, ТАД, энхансеры, промоторы, СТСФ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТАД – топологически ассоциированный домен; СТСФ – СССТС-связывающий фактор; С2Н2 – домен, состоящий из двух остатков цистеина и двух остатков гистидина, координированных ионом цинка.

ВВЕДЕНИЕ

Значительное усложнение процессов регуляции экспрессии генов у высших эукариот стало следствием дифференцировки клеток в сложно устроенных организмах. Известно, что специализация клеток определяется репертуарами транскрипционных факторов, собирающихся на геномных регуляторных элементах. Гены, ответственные за дифференцировку клеток, обычно регулируются энхансерами, каждый из которых активирует промотор в течение заданного временного промежутка в определенной группе клеток [1–3]. В ряде случаев транскрипция генов развития регулируется десятками энхансеров, часть из которых может быть удалена от регулируемого промотора на расстояния, достигающие сотен тысяч пар нуклеотидов.

Способность энхансеров стимулировать промоторы на больших расстояниях привела к предположению о том, что должны существовать особые

транскрипционные домены, или компартменты, внутри которых устанавливаются взаимодействия между энхансерами и промоторами [4]. Считалось, что на границе таких транскрипционных доменов должны находиться специальные регуляторные элементы, способные блокировать взаимодействия между энхансерами и промоторами, расположенными в соседних доменах [5, 6]. Согласно наиболее распространенному мнению, границы доменов взаимодействуют либо между собой, либо с ядерными структурами, прикрепленными к ядерной оболочке. Действительно, регуляторные элементы, имеющие предсказанные свойства, нашли сначала у дрозофилы, а потом у млекопитающих, и называли инсуляторами [7]. С использованием модельных систем в трансгенных линиях дрозофилы описаны два основных свойства инсуляторов: способность блокировать взаимодействие между энхансерами и промоторами и защищать экспрессию трансгена от репрессии

при его интеграции в гетерохроматиновые области генома [5, 6].

Появление полногеномных методов анализа, позволяющих идентифицировать всю совокупность взаимодействий между участками хроматина *in vivo*, и микроскопии высокого разрешения [8–11] вывело изучение пространственной организации генома на новый уровень. Оказалось, что хромосомы всех эукариот организованы в топологически ассоциированные домены (ТАДы), которые часто формируются за счет предпочтительного взаимодействия друг с другом концов, или границ, домена [12–15]. Контакты внутри ТАДа устанавливаются с более высокой частотой по сравнению с контактами между ТАДами.

Открытие ТАДов дало основание предполагать, что их границы соответствуют инсуляторам, ограничивающим независимые регуляторные домены [16–18]. Однако исследования, проведенные прежде всего на единичных клетках, показали, что границы ТАДов формируются как совокупность предпочтительных контактов и не представляют собой строгих физических барьеров, блокирующих любые транс-взаимодействия между регуляторными элементами, расположенными в разных ТАДах [12, 14, 19, 20]. Большая часть охарактеризованных инсуляторов, взаимодействующих энхансеров и промоторов содержится внутри одного ТАДа, что, вероятно, способствует формированию его пространственной структуры. Увеличение разрешения карт пространственных взаимодействий внутри ТАДов привело к обнаружению субдоменов, которые обычно соответствуют локальным контактам между регуляторными элементами [19].

СТСФ КАК НАИБОЛЕЕ ИЗУЧЕННЫЙ БЕЛОК С КЛАСТЕРОМ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ С2Н2-ТИПА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Белок СТСФ (ССТС binding factor) позвоночных, хорошо изученный у человека и мыши [21, 22], экспрессируется на всех стадиях развития во всех типах клеток и необходим в процессе эмбрионального развития. В зависимости от контекста СТСФ может выступать в роли активатора или репрессора транскрипции, он принимает участие в инактивации одной из X-хромосом у млекопитающих, регулирует альтернативный сплайсинг пре-мРНК некоторых генов, контролирует импринтинг, участвует в рекомбинации и репарации, определяет активность энхансеров, промоторов и инсуляторов. Однако наиболее детально описана ключевая роль белка СТСФ позвоночных в организации архитектуры хромосом [23–25]. В геноме млекопитающих присутствует от 40000 до 80000 сайтов связывания СТСФ, из которых более 5000

сайтов консервативны между различными видами и клеточными линиями [21, 26]. Приблизительно 50% сайтов связывания СТСФ находятся в межгенных областях, ~ 15% расположены вблизи промоторов, а ~ 35% внутригенные (30% в интронах и 5% в экзонах) [27].

СТСФ млекопитающих состоит из неструктурированных концевых областей и расположенного в центральной части кластера 11 цинковых пальцев, из которых первые 10 относятся к типу С2Н2, а последний – С2НС. Стоит отметить, что белки, содержащие один и, реже, несколько кластеров доменов С2Н2, составляют значительную часть от общего количества С2Н2-белков [28].

Классический С2Н2-домен имеет консенсусную последовательность $CX_{2-4}CX_{12}HX_{2-8}H$. В присутствии иона цинка эта последовательность складывается в $\beta\alpha$ -структуру, в которой цинк тетраэдрически координируется двумя цистеинами на одном конце β -листа и двумя гистидинами в С-концевой части α -спирали. Структура стабилизируется гидрофобными связями. В каноническом комплексе tandemные цинковые пальцы С2Н2 погружены в большую бороздку ДНК α -спиральными участками. Высокоаффинное и специфичное связывание опосредовано специфическими взаимодействиями с азотистыми основаниями и неспецифическими контактами с фосфатным остовом ДНК. К любому триплету ДНК можно подобрать специфически узнающий его С2Н2-домен, который будет содержать подходящие аминокислоты в ключевых позициях α -спирали [29–31]. Поэтому уже через несколько лет после описания первой структуры С2Н2-доменов с ДНК химерные белки, состоящие из кластера С2Н2-доменов и домена FokI, вносящего двухцепочечные разрывы в последовательность ДНК, стали активно использоваться в качестве сайт-специфичных эндонуклеаз для внесения целевых изменений в геном [32, 33].

В белках с кластером цинковых пальцев С2Н2-типа короткие пятиаминокислотные линкеры, располагающиеся между доменами, имеют консенсусную последовательность TGEKР и являются характерной особенностью ДНК-связывающих С2Н2-белков [34]. Линкеры оказывают критическое влияние на аффинность и специфичность связывания с ДНК, а мутации в них могут приводить к потере функции белка *in vivo* [35, 36]. Считается, что каждый аминокислотный остаток линкера играет свою роль при взаимодействии с ДНК. Белковая структура из нескольких С2Н2-доменов, гибкая в свободном состоянии, «защелкивается», как только встречает правильную последовательность ДНК. При этом ОН-группа первого треонина Т1 (или серина) образует водородную связь с амидной группой глутаминовой кислоты Е3,

а глицин G2 обеспечивает необходимую для защелкивания гибкость основной цепи. Глутаминовая кислота E3 может играть роль в стабилизации контактов между цинковыми пальцами. Лизин K4 (или аргинин) образует контакт с фосфатным остовом ДНК. Пролин P5, вероятно, укрепляет связь между линкером и последующим цинковым пальцем, при этом он фиксирует следующий за ним консервативный остаток фенилаланина или тирозина, ароматическое кольцо которых укладывается на N-конец α-спирали [37]. В белке CTCF человека ДНК-связывающие C2H2-домены также соединены TGEKP-подобными линкерами (рис. 1).

Конформационные изменения в структуре ДНК, вносимые C2H2-доменами при образовании комплекса, ограничивают число взаимодействующих с ДНК C2H2-доменов, соединенных короткими линкерами, и, соответственно, длину канонического сайта связывания [37]. Вероятно, поэтому в большей части белков только 4–5 C2H2-доменов участвуют во взаимодействии и специфичном узнавании сайта ДНК длиной 12–15 п.н. В исследованиях с искусственно созданными C2H2-кластерами показано, что специфичность связывания белка с ДНК повышается, когда несколько коротких ДНК-узнающих кластеров C2H2-доменов соединены более длинными неканоническими линкерами [28]. Поэтому можно предположить, что белки, содержащие большое число C2H2-доменов в кластере, могут специфично узнавать сайты ДНК с разной последовательностью.

В составе CTCF человека 3–7 C2H2-домены отвечают за специфичное связывание с консенсусной последовательностью длиной 15 п.н. (рис. 1) [38]. C2H2-домен 8, находясь вне большой бороздки, не участвует в узнавании азотистых оснований ДНК и поэтому может служить мостиком, соединяющим 3–7 C2H2-домены, узнающие основной мотив, с 9–11 C2H2-доменами, которые могут специфично связываться с дополнительным ДНК-мотивом, присутствующим примерно в 15% сайтов связывания CTCF [39, 40]. 1–2 C2H2-домены также могут связываться с неконсервативной последовательностью ДНК [39]. Таким образом, разные комбинации C2H2-доменов белка CTCF могут с разной эффективностью связываться с широким спектром мотивов [41, 42].

В экспериментах *in vitro* показано, что связывание CTCF с ДНК ингибируется при метилировании цитозина в положении 2 в консенсусном сайте, в то время как метилирование цитозина в положении 12 практически не имеет эффекта. В положении 2 цитозин узнается остатком аспарагиновой кислоты, предпочитающим немодифицированное основание, а в положении 12 – остатком глутаминовой кислоты, демонстрирующим незначительное увеличение

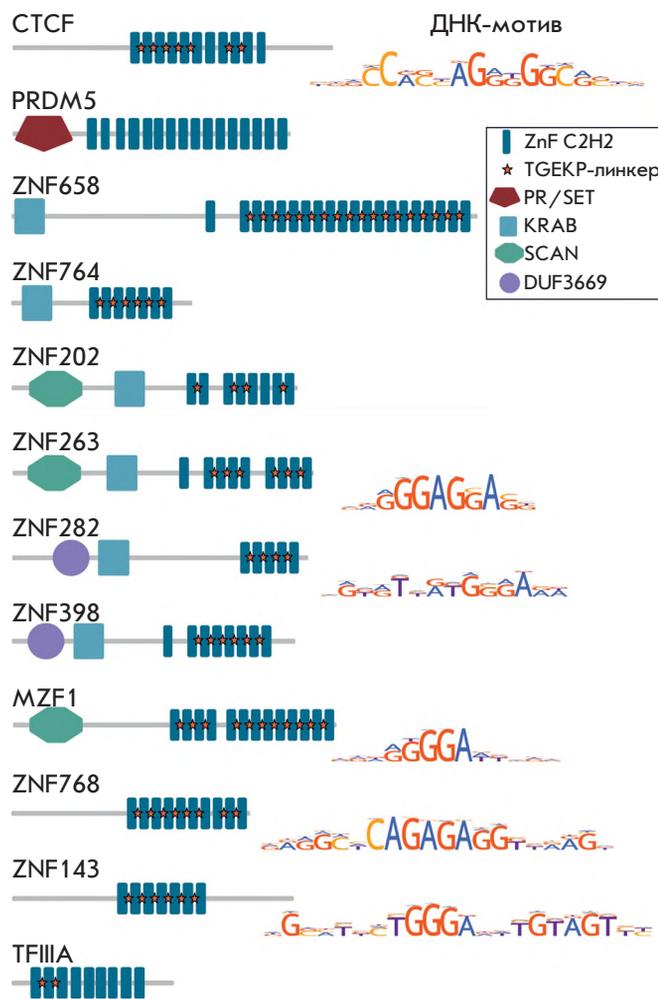


Рис. 1. C2H2-белки позвоночных с архитектурными функциями. Показаны доменная организация описанных белков и известные мотивы связывания

аффинности связывания с метилированным основанием [38]. Кроме того, важную роль в распознавании метильной группы играет остаток аргинина, образующий в комплексе с ДНК триаду 5-метилцитозин–аргинин–гуанин, характерную для всех комплексов C2H2-белков с метилированной ДНК [43, 44].

Метилирование цитозина в сайтах связывания может усилить, ослабить или полностью заблокировать связывание C2H2-белков с ДНК, т.е. является глобальным механизмом регуляции активности промоторов, энхансеров и инсуляторов [45]. Наиболее яркий пример роли метилирования сайтов связывания C2H2-белков – участие CTCF в геномном импринтинге, эпигенетическом механизме регуляции экспрессии аллелей одного гена, в зависимости от их происхождения – мужского или женского [46]. Импринтинг осуществляется с помощью специальных регулятор-

ных элементов, получивших название дифференциально метилированных областей (ДМО), которые часто содержат сайты связывания СТСФ. Наиболее хорошо описан импринтинг на генах *Igf2* и *H19*, которые активируются группой расположенных рядом энхансеров. ДМО, выполняющий функцию инсультатора, находится между геном *Igf2* и энхансерами и состоит из четырех сайтов связывания СТСФ, имеющих цитозин во втором положении. Метилирование ДМО поддерживается только в локусе *Igf2/H19* отцовского происхождения, что приводит к потере связывания СТСФ и к активации гена *Igf2*. При этом в материнском локусе СТСФ связывается со своими сайтами в ДМО, что приводит к блокированию взаимодействия между энхансерами и геном *Igf2*.

Метилирование сайтов связывания транскрипционных факторов и, в частности С2Н2-белков, также может участвовать в процессе инактивации транскрипции в одной из двух X-хромосом млекопитающих [47].

Кластеры С2Н2-доменов могут участвовать в специфичном и неспецифичном взаимодействии с РНК [48, 49]. Наиболее хорошо исследовано специфичное взаимодействие белка TFIIIA с 5S РНК. Показано, что 1–3, 5 и 7–9 С2Н2-домены связываются с ДНК-мотивами в промоторной области гена 5S РНК, а 4, 5 и 6 С2Н2-домены взаимодействуют с 5S РНК. Таким образом, с одной стороны, С2Н2-домены 4 и 6 являются линкерами, расширяющими возможности связывания белка TFIIIA с ДНК, а с другой стороны, они, взаимодействуя с синтезируемой 5S РНК, стабилизируют ее при экспорте из ядра в цитоплазму до сборки рибосомы.

Два С2Н2-домена, 1 и 10, отвечают за неспецифичное взаимодействие СТСФ с большим спектром РНК [50, 51]. При этом нарушение структуры С2Н2-доменов в результате мутации остатка гистидина не влияет на связывание РНК. Этот результат предполагает важную роль отдельных аминокислот С2Н2-доменов в связывании РНК, а не структуры цинкового пальца в целом. Существуют экспериментальные данные, показывающие, что взаимодействие СТСФ с РНК может приводить к его мультимеризации, однако механизм этого процесса остается неизвестным [50, 52]. Так как достаточно большая часть сайтов СТСФ находится в интронах генов, можно ожидать, что СТСФ, неспецифично связываясь с РНК, участвует в регуляции процессов сплайсинга и терминации синтеза пре-мРНК, которые протекают сопряженно с этапами транскрипции. Например, СТСФ способен замедлять движение РНК-полимеразы II, тем самым приводя к выбору альтернативного экзона при сплайсинге [53, 54] или альтернативного сигнала полиаденилирования

при терминации транскрипции [55]. В С-концевом домене белка СТСФ картирован домен, способный взаимодействовать с РНК-полимеразой II, что может объяснить эффект ее торможения при движении через сайты связывания СТСФ [56].

Большое количество экспериментальных данных показывает, что отдельные С2Н2-домены или их кластеры участвуют в белок-белковых взаимодействиях [34]. Однако детальные механизмы этих процессов и их специфичность почти неизучены. С2Н2-домены часто взаимодействуют с белковыми комплексами, ремоделирующими хроматин и вносящими модификации в гистоны. Согласно данным мутационного анализа, в таких взаимодействиях могут участвовать (в отличие от связывания с ДНК) любые аминокислоты в составе С2Н2-доменов и соединяющих их линкеров, поэтому предполагается, что С2Н2-домены в некоторых случаях могут, находясь в связанном с ДНК состоянии, привлекать на хроматин регуляторные комплексы.

Кластер С2Н2-доменов – единственная консервативная часть белка СТСФ, имеющая высокий уровень гомологии у большей части позвоночных, насекомых и некоторых нематод [57–59]. Белок СТСФ не найден у растений, дрожжей и круглых червей. Распределение сайтов связывания СТСФ в геноме также характеризуется некоторой степенью консервативности, в частности, они найдены на границах регуляторных доменов гомеозисных генов млекопитающих, рыб и дрозофилы [60, 61], где СТСФ выполняет инсультаторные функции, разграничивая зоны действия энхансеров, расположенных в соседних доменах [62–66]. Стоит отметить, что сайты связывания СТСФ найдены в повторяющихся элементах генома млекопитающих, что, возможно, в процессе эволюции стало отправной точкой экспансии сайтов связывания СТСФ в межгенных областях, в которых располагаются границы ТАДов [26, 67].

Несмотря на отсутствие участков гомологии, N-концевые домены белка СТСФ у девяти видов животных разных классов представлены неструктурированными гомодимеризующимися доменами [68]. Делеция димеризующегося домена в составе СТСФ дрозофилы приводит к значительному снижению функциональной активности мутантного СТСФ [69]. На эмбриональных стволовых клетках мыши выявлено участие N-концевого домена в специфичном связывании СТСФ со своими сайтами [70]. На N-конце СТСФ человека между гомодимеризующимся доменом и С2Н2-кластером находится мотив YxF, необходимый для взаимодействия с когезиновым субкомплексом SA2–SCC1 [71]. Аналогичный мотив найден и у СТСФ других видов животных. Таким образом, N-концевые домены белка СТСФ разных ор-

ганизмов обладают общими характерными чертами строения, несмотря на отсутствие выраженной гомологии.

Ранее на С-конце белка CTCF *in vitro* картировали участок, который взаимодействует непосредственно с субъединицей SA2 когезинового комплекса [72], но в новом исследовании этот результат не был подтвержден [71].

Функции С2Н2-белков во многом определяются белками, с которыми они взаимодействуют. Достоверно выявлено более 90 белков-партнеров CTCF [73, 74], однако механизмы и специфичность таких взаимодействий остаются под вопросом. Большая часть белок-белковых взаимодействий локализована в кластере С2Н2-доменов и в неструктурированной С-концевой части белка CTCF. Вероятно, многие С2Н2-белки способны взаимодействовать с одинаковыми белковыми комплексами за счет С2Н2-доменов. Показано, что CTCF взаимодействует непосредственно с каталитической субъединицей BRG1 из комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF [74] и общим фактором транскрипции II-I (TFII-I) [75]. Таким образом, наиболее вероятная функция CTCF в области промоторов активно транскрибирующихся генов состоит в участии в наведении зоны открытого хроматина путем привлечения комплекса SWI/SNF, увеличивающего подвижность нуклеосом. Также CTCF может участвовать в стабилизации на промоторах TFIIID-комплекса, частью которого является TFII-I. При инактивации CTCF заметное падение уровня экспрессии детектируется только у тех генов, в промоторных областях которых расположены сайты связывания CTCF [76]. Таким образом, одна из основных функций CTCF – организация активных промоторов. Интересно, что CTCF, как и многие другие С2Н2-белки, содержит участки, обогащенные пролином и кислыми аминокислотами, что характерно для активаторов транскрипции, привлекающих на хроматин транскрипционные комплексы.

В С-концевой части CTCF идентифицирован домен, который взаимодействует с РНК-хеликазами DEAD [74, 77], что может быть связано с потенциальным участием CTCF в регуляции сплайсинга и терминации транскрипции. Для реализации функций CTCF важно его прямое взаимодействие с топоизомеразой II (Top2) [78], которая регулирует топологию хроматина, внося АТР-зависимые двойные разрывы в ДНК. Белок Top2 обнаружен примерно на половине сайтов связывания CTCF [78]. Активность Top2 наиболее часто реализуется в непосредственной близости от сайтов связывания CTCF [79]. Предполагается, что Top2 рекрутируется на открытые участки хроматина, формируемые на сайтах CTCF, что усиливается прямыми белок-белковыми контактами. Можно

предположить, что CTCF помогает рекрутировать Top2 в интроны и 3'-области генов, что может быть необходимым при прохождении этапов транскрипции генов.

Активность С2Н2-белков регулируется путем внесения различных посттрансляционных модификаций. Наиболее хорошо исследовано фосфорилирование С2Н2-белков по линкерам между С2Н2-доменами, происходящее в процессе митоза и приводящее к снижению эффективности связывания белков с хроматином [80–83]. С2Н2-белки могут подвергаться и другим модификациям, таким, как присоединение убиквитина, сумо, поли-ADP-рибозилирование [84]. Сайт рибозилирования находится на N-конце CTCF [85], и эта модификация может влиять на димеризацию белка и его связывание с когезиновым комплексом. Поли-ADP-рибозилирование влияет на локализацию белка CTCF в ядерных компартментах, связывание с хроматином и регуляцию транскрипции [85–87]. Интересно, что N-конец CTCF человека взаимодействует с С-концевым доменом нуклеофосмина 1 (NPM1), который может определять локализацию CTCF в клетке [88]. В концевых доменах белка CTCF найдены сайты ковалентного присоединения белка SUMO через лизин CTCF [89]. Белок Pc2, принадлежащий к группе репрессоров транскрипции Поликомб, идентифицирован в качестве SUMO E3-лигазы для CTCF. В ядрах клеток CTCF и Pc2 найдены в тельцах, обогащенных белками группы Поликомб. Предполагается, что SUMO, взаимодействуя с различными белками и формируя гомополимеры, служит катализатором формирования плотных белковых гранул, которые могут иметь много функций и, в том числе, быть источником запасных белков при формировании хроматина на вновь синтезируемой ДНК в процессе репликации [90, 91]. Сумоилирование CTCF на хроматине также может выступать регулятором привлечения транскрипционных комплексов на хроматин, меняя тем самым свойства CTCF при активации или репрессии транскрипции генов.

CTCF как типичный представитель С2Н2-белков обладает типичными для них структурными особенностями, такими, как кластер цинковых пальцев, обеспечивающий специфичное связывание с геномными мишенями и взаимодействие с РНК и белками, концевые домены, необходимые для установления дистанционных контактов и взаимодействия с различными регуляторными комплексами.

CTCF В ОРГАНИЗАЦИИ АРХИТЕКТУРЫ ХРОМОСОМ И ИНСУЛЯЦИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ

Белок CTCF первоначально рассматривали как основной инсуляторный белок позвоночных [92].

Первый инсулятор позвоночных был описан на границе гетерохроматинового района и кластера β -глобиновых генов курицы [93, 94]. Инсулятор, ко- ровая часть которого состоит из 275 п.н., был кар- тирован в гиперчувствительном к ДНКазе I районе и поэтому назван HS4 [95]. В модельных клеточных трансгенных системах инсулятор HS4 способен в од- ной или нескольких копиях блокировать активность энхансеров и защищать экспрессию трансгена от ре- прессии окружающим хроматином. Кроме сайта связывания белка CTCF, в HS4-инсуляторе найде- ны сайты связывания белков USF1/USF2 [96] и три сайта связывания белка VEZF1 (Vascular endothelial zinc finger 1) [97]. Показано, что CTCF нужен для бло- кирования энхансеров и рекрутирования белков USF1/USF2, которые, в свою очередь, привлекают комплексы, ремоделирующие и модифицирующие нуклеосомы. В результате нуклеосомы в районе HS4-инсулятора, как и на активных промоторах, оказы- ваются обогащены гистоном H3, метилированным по лизину 4, и ацетилованными гистонами H3 и H4.

Белок VEZF1 содержит кластер, состоящий из ше- сти C2H2-доменов, и преимущественно связывается с активными промоторами [98]. Инактивация сайтов связывания белка VEZF1 в трансгенных клеточных линиях усиливает метилирование ДНК на HS4-инсуляторе и промоторе репортерного гена [97]. Предполагается, что VEZF1 рекрутирует комплекс, который деметилюет ДНК и тем самым поддержи- вает рекрутирование на HS4-инсулятор и соседние регуляторные элементы транскрипционных фак- торов, которые не могут эффективно связываться с метилированными сайтами. Таким образом, HS4-инсулятор представляет собой комбинацию сайтов связывания нескольких белков, которые связывают- ся с хроматином и функционируют в тесной коопера- ции друг с другом.

Несмотря на многочисленные примеры ключе- вой роли сайтов CTCF в организации границ регу- ляторных доменов и инсуляции энхансеров [23], от- крытым остается вопрос о роли других неизвестных белков, связывание которых с конкретным регуля- торным элементом зависит от присутствия CTCF, как это показано для белков USF1/USF2 и HS4-инсулятора. Например, у млекопитающих иденти- фицировано большое количество CTCF-зависимых инсуляторов, которые блокируют распространение Поликомб-зависимого гетерохроматина, связанно- го с обогащением протяженных участков хромати- на модификацией H3K27me3. Однако инактивация CTCF не приводит к распространению модификации H3K27me3 в этих районах, что предполагает при- сутствие на границах других белков, блокирующих распространение репрессивного хроматина и тем

самым маскирующих отсутствие CTCF [76]. Таким образом, CTCF-зависимые инсуляторы, границы ре- гуляторных доменов и ТАДов состоят, скорее всего, из CTCF-сайтов в комбинации с сайтами связывания других транскрипционных факторов, включая еще неописанные C2H2-белки.

Согласно современным представлениям, подкре- пленным многочисленными экспериментальными результатами, CTCF млекопитающих в кооперации с когезиновым комплексом формирует границы хро- матиновых петель и определяет границы большей части ТАДов [19, 99]. Когезиновый комплекс участву- ет в процессах митоза, мейоза и регуляции экспрес- сии генов [100, 101]. Этот комплекс состоит из белков SMC1, SMC3 и SCC1 (Rad21), образующих кольцевую структуру и связывающихся через SCC1 с четвертой субъединицей, которая существует в виде двух изо- форм, STAG1 (SA1) и STAG2 (SA2). Предполагается, что SA1 и SA2 могут определять локализацию коге- зинового комплекса на разных хроматиновых сай- тах. Комплекс NIPBL/MAU2 и WAPL катализируют АТФ-зависимое связывание когезинового комплекса с хроматином и его последующую диссоциацию соот- ветственно [100].

В зависимости от исследуемых компонентов коге- зинового комплекса, используемых антител к CTCF и клеточных линий наблюдается 40–95% колокали- зация сайтов CTCF и когезина [102–104]. При инак- тивации CTCF наблюдается перераспределение ко- гезиновых комплексов с сайтов связывания CTCF на промоторы активных генов, что сопровождается частичным нарушением конфигурации ТАДов [76]. Инактивация субъединиц когезинового комплекса или белка NIPBL [105, 106], обеспечивающего ре- крутирование когезинового комплекса на хроматин, приводит к почти полному исчезновению ТАДов. Наоборот, при инактивации факторов, негативно влияющих на связывание когезина с хроматином, происходит стабилизация ТАДов и дистанционных взаимодействий в хроматине [106]. Наконец, мутации и делеции в CTCF, которые нарушают его взаимо- действие с когезиновым комплексом, также приводят к значительным нарушениям процессов формиро- вания дистанционных взаимодействий и ТАДов [71, 104]. Субъединицы Smc1 и Smc3 содержат АТФ-зависимые домены, и энергия расщепления АТФ нужна при по- садке и диссоциации когезинового комплекса [107, 108]. При этом мутации в субъединицах когезиново- го комплекса, нарушающие гидролиз АТФ, влияют на дистанционные взаимодействия и организацию хромосом в ТАДы [109].

Сайты CTCF на границе ТАДов обычно находят- ся в конвергентной ориентации [8, 110]. Показано, что взаимная ориентация мотивов CTCF определяет

пары сайтов CTCF, которые преимущественно стабилизируют петли ДНК [8, 110–112]. Для объяснения предпочтительного формирования хроматиновых петель между CTCF-сайтами, расположенными в конвергентной ориентации, предложена модель экструзии петель, согласно которой когезиновый комплекс после загрузки на хроматин запускает экструзию ДНК с формированием хроматиновой петли. CTCF может блокировать продвижение когезинового комплекса только в том случае, если его N-концевой домен, взаимодействующий с субкомплексом SA2–SCC1 [71], правильно экспонирован по отношению к движущемуся когезиновому комплексу.

Модель постулирует, что когезиновый комплекс может активно (с использованием энергии АТФ) или пассивно индуцировать экструзию хроматина с образованием петель. Действительно, *in vitro* показано, что в присутствии NIPBL и молекул АТФ когезиновый комплекс связывается с молекулой ДНК и перемещается по ней с образованием петли [113], даже если ДНК связана с нуклеосомами [114]. Когезин также может преодолевать небольшие белковые комплексы нуклеосомного размера, однако неодолимой преградой являются комплексы диаметром более 13 нм, которые при наличии моторной функции могут сами перемещать когезин [115]. Таким образом, конвергентные сайты CTCF ограничивают участки выпетливания хроматиновых петель, а само формирование петель обеспечивается молекулярными моторами.

Согласно полимерной модели процесс формирования ТАДов во многом зависит от физических свойств хроматина, у которого ярко выражено стремление к формированию доменов одного типа. Такая тенденция особенно заметна на модели дрозофилы, в которой показан механизм формирования ТАДов с помощью электростатических межнуклеосомных взаимодействий. В результате границы таких доменов представлены протяженными участками открытого хроматина, а ТАД оказывается более плотной структурой [13, 19, 116, 117]. При этом в рамках такой модели роль CTCF заключается в рекрутировании когезиновых комплексов, которые стабилизируют взаимодействия между уже сближенными участками хроматина. Однако такая модель не объясняет, почему хроматиновые петли у млекопитающих формируются преимущественно только конвергентно расположенные сайты связывания CTCF.

Согласно экспериментальным данным [107, 113, 118], размер хроматиновой петли зависит не от времени связывания когезина с ДНК, а от преград, ограничивающих его продвижение (подобных CTCF). CTCF динамически связывается с хроматином, что согласуется с гетерогенностью границ

ТАДов, наблюдаемой при исследовании единичных клеток [20]. На границах ТАДов сайты связывания CTCF обычно представлены кластерами, что, возможно, и обеспечивает связывание CTCF с геномными мишенями на протяжении более длительного времени [119].

Согласно экструзионной модели, когезиновые комплексы только временно блокируются на конкретном CTCF-сайте и могут продолжить протягивание хроматина либо в результате преодоления блока, созданного CTCF, либо в результате ухода CTCF с хроматина [20]. Инактивация белка WAPL приводит к стабилизации связывания когезиновых комплексов с хроматином, при этом наблюдается увеличение размера хроматиновых петель, что объясняется увеличением времени, которое когезиновый комплекс проводит на хроматине [106, 120, 121].

В процессе митоза происходит конденсация хромосом, сопряженная с масштабными изменениями в хроматине и потерей связывания с ДНК части транскрипционных факторов. Во время профазы митоза большая часть когезина уходит с хромосом за исключением когезина, ассоциированного с центромерами. Во время анафазы происходит диссоциация когезина под действием сепаразы, что способствует расхождению сестринских хроматид [101]. На компактных митотических хромосомах структура ТАДов практически теряется, но быстро восстанавливается к середине стадии G1 [122]. Данные о связывании CTCF со своими сайтами на митотических хромосомах противоречивы. По некоторым оценкам, 18.6% сайтов находятся в связанном с CTCF состоянии [122], но показано также, что связывание CTCF со своими сайтами в основном теряется при фосфорилировании линкеров между C2H2-доменами [123]. Вероятно, уход CTCF со своих сайтов помогает более эффективно удалить когезиновые комплексы с митотических хромосом. Однако после митоза происходит быстрое восстановление мест связывания CTCF, что может быть следствием ассоциации свободного CTCF с конденсированными хромосомами в процессе митоза [123]. Остается открытым вопрос, каким образом осуществляется эффективное восстановление связывания CTCF со своими сайтами после митоза. Наиболее вероятно, что другие транскрипционные факторы остаются на митотических хромосомах и поддерживают частично открытое состояние хроматина (выполняют роль меток), что облегчает связывание CTCF со своими сайтами после митоза. В результате после репликации ДНК наблюдается быстрое восстановление как профиля связывания CTCF, так и структуры ТАДов на дублированных хромосомах. Можно предположить, что избыточная часть CTCF

находится в специализированных ядерных компартментах, которые стабилизируются SUMO [89]. При репликации избыточное количество CTCF используется для взаимодействия с увеличивающимся числом сайтов связывания.

ДРУГИЕ C2H2-БЕЛКИ ПОЗВОНОЧНЫХ С АРХИТЕКТУРНЫМИ ФУНКЦИЯМИ

В работах по созданию искусственных цинковых пальцев C2H2-типа для обеспечения специфичного взаимодействия с определенной мишенью в геноме показано резкое повышение специфичности связывания с ДНК кластера из пяти правильно организованных цинковых пальцев. Поэтому в данной главе мы рассмотрим белки с такой структурной организацией (имеющие не менее пяти доменов C2H2-типа, разделенных типичным линкерным участком из 6 п.н.) как наиболее перспективные в качестве архитектурных белков.

Другие C2H2-белки пока сравнительно менее изучены, чем CTCF [124, 125]. Основные проблемы при исследовании белков этого класса обусловлены высокой степенью дублирования функций у разных C2H2-белков и отсутствием качественных специфичных антител к этим белкам, которые сделают возможным проведение полногеномных исследований для идентификации сайтов связывания C2H2-белков и их роли в поддержании дистанционных взаимодействий между регуляторными элементами и формировании архитектуры хромосом. В двух работах [126, 127] изучены сайты связывания 60 и 221 C2H2-белков, тагированных эпитопами GFP или HA, в клетках HEK293T. Оказалось, что сайты связывания одних и тех же C2H2-белков, изученных в обеих работах, перекрываются друг с другом совсем незначительно [128]. Нужно отметить, что в этих работах экспрессия тагированных C2H2-белков происходила на фоне эндогенного C2H2-белка, так что большая часть реальных сайтов связывания была закрыта нативным белком, в то время как тагированный белок связывался в основном неспецифично с районами в зонах открытого хроматина. Вероятно, использование CRISPR/Cas9-редактирования позволит в ближайшем будущем заменять эндогенные гены модифицированными, экспрессирующими тагированные варианты C2H2-белков, что упростит их детальное исследование.

Приблизительно половина генома млекопитающих насыщена разными вариантами повторяющихся последовательностей различной природы, включая мобильные элементы и ретровирусы [129]. Большая часть изученных C2H2-белков, и в том числе CTCF, имеют сайты связывания в мобильных элементах [130–133]. При этом такие повторяющиеся последо-

вательности становятся частью регуляторных систем генов и границ ТАДов [134], что значительно расширяет возможности тонкой адаптации экспрессии генов в процессе эволюции.

Примерно половина всех белков с C2H2-доменом содержит на N-конце еще один домен. Два эволюционно наиболее древних домена, которые встречаются у всех эукариот, это PR/SET-домен (например, белок PRDM5 (рис. 1)), обладающий, как правило, метилтрансферазной активностью [135], и VTB-домен, формирующий димеры или мультимеры и привлекающий регуляторы транскрипции к геномным мишеням [136]. Одна из самых многочисленных групп C2H2-белков млекопитающих имеет на N-конце KRAB-домен (например, белки ZNF658 и ZNF764 (рис. 1)). Полагают, что этот домен получил широкое распространение у млекопитающих благодаря своей репрессорной функции по отношению к мобильным элементам. Однако параллельно с эволюцией регуляторных систем генов, в которые интегрируются мобильные элементы, KRAB-C2H2-белки приобретают новые функции в регуляции экспрессии хозяйских генов [130, 131]. Часть таких C2H2-белков с KRAB-доменом содержит на N-конце дополнительный домен – SCAN (например, белки ZNF202 и ZNF263) или DUF3669 (например, белки ZNF282 и ZNF398) [137–139]. Некоторые C2H2-белки содержат только SCAN-домен (например, MZF1) и происходят из белков, потерявших KRAB-домен. Можно предположить, что часть функций этих белков связана со способностью SCAN и DUF3669 к формированию гомо- и гетеродимеров между SCAN-C2H2 и DUF3669-C2H2 соответственно [131, 137].

Наиболее хорошо описано участие C2H2-белков в создании зоны открытого хроматина на промоторах генов и привлечении транскрипционных комплексов, вовлеченных в активацию или репрессию транскрипции. Белок ZNF658 участвует в активации экспрессии генов рРНК, которые транскрибируются РНК-полимеразой I, и связывается с регуляторным элементом, расположенным рядом с 3525 промоторами [140, 141]. Белок ZNF764 экспрессируется повсеместно, он вовлечен в регуляцию активности глюкокортикоидных, андрогенных и тиреоидных гормонов [142]. Интересно, что сайты связывания преимущественно находятся в межгенных участках (60%) и интронах (31%), при этом в значительной степени они (37%) колокализуются с сайтами глюкокортикоидных рецепторов (GR) [143]. Экспериментально доказано прямое взаимодействие между KRAB-доменом ZNF764 и LBD-доменом GR, что предполагает кооперативное связывание этих белков с регуляторными районами.

Сайты связывания белков ZNF202 [126, 144], ZNF263 [145], MZF1 [146], ZNF768 [133], PRDM5 [147] преимущественно найдены в промоторных областях генов, что свидетельствует о возможной роли данных факторов в активации и репрессии транскрипции.

На N-конце белка ZNF768 (рис. 1) находятся 15 гептадных повторов, имеющих сходство с C-концевым доменом РНК-полимеразы II [133] и, предположительно, участвующих в рекрутировании на промотор комплекса элонгации транскрипции.

Показано, что, используя SCAN-домен, MZF1 может гетеродимеризоваться с другими SCAN-содержащими белками – ZNF24, ZNF174 и ZNF202 [148, 149]. Белки ZNF282 и ZNF398 гомо- и гетеродимеризуются через DUF3669-домен [150] и могут связываться с промоторами комбинаторным способом [126]. Белок PRDM5 содержит N-концевой PR/SET-домен, который утратил метилирующую активность и, вероятно, участвует в белок-белковых взаимодействиях [151, 152].

Наиболее хорошо охарактеризован белок ZNF143 (рис. 1), необходимый для эмбрионального развития млекопитающих [153]. В центральной части белка расположен кластер из семи C2H2-доменов. N-Концевой домен содержит три повтора из 15 аминокислот, между которыми находятся спейсеры длиной 10–12 аминокислот [154]. C-Концевой домен обогащен кислыми аминокислотами, что характерно для активаторов транскрипции. Сайты связывания ZNF143 локализованы в области примерно 2000 промоторов, которые регулируются РНК-полимеразами II и III [155–158]. Функциональная активность ZNF143 в области промоторов связана с формированием зон открытого хроматина и участия в привлечении комплексов, активирующих транскрипцию [159–161]. Белок ZNF143 имеет два частично перекрывающихся консенсусных сайта связывания с одинаковой коровой последовательностью CCCAGA [155], что можно объяснить разным вкладом отдельных C2H2-доменов в узнавание двух вариантов сайтов. Полногеномные исследования показали, что белок ZNF143 может участвовать в формировании хроматиновых петель между энхансерами и промоторами [155, 156, 162–164].

Достаточно большой процент сайтов связывания белков PRDM5 и ZNF143 колокализуются с CTCF [143, 152, 163]. Белок PRDM5 обнаружен в комплексе с когезином и CTCF [152]. На клетках HEK293T показано, что инактивация ZNF143 приводит к нарушению некоторых CTCF-зависимых хроматиновых петель [163]. Однако отсутствуют экспериментальные данные о том, что ZNF143 (в отличие от CTCF) может участвовать в локализации когезинового комплекса на хроматине.

Другой пример структурной функции C2H2-белков можно наблюдать при исследовании архитектуры хроматина, которая организуется TFIIIC-комплексом. Установлено, что сайты связывания TFIIIC-комплекса колокализуются с конденсинами и могут служить границами между активным хроматином и гетерохроматином, а также поддерживать дистанционные взаимодействия, т.е. активно участвовать в формировании архитектуры хромосом [165]. Интересно, что сайты связывания белков PRDM5, CTCF/когезина, ZNF143 находятся рядом или колокализуются с районами связывания TFIIIC [152, 155, 166], что предполагает кооперативное участие этих белков в организации TFIIIC-зависимых регуляторных элементов. Более того, PRDM5 выделен в комплексе с TFIIIC, что предполагает участие PRDM5 в рекрутировании TFIIIC-комплекса на хроматин [152].

В заключение следует упомянуть второй (после CTCF) хорошо описанный C2H2-белок, TFIIIA, который у всех эукариот связывается с Pol III-зависимыми промоторами генов, кодирующих 5S рРНК [167]. В отличие от CTCF у TFIIIA, который обычно состоит из девяти C2H2-доменов и C-концевого активационного домена, названного TAS (Transcription Activating Signal, сигнал активации транскрипции), консервативной является только общая организация. Белок связывается с регуляторным элементом, названным ICR, который находится в транскрибируемой части гена. Структурный анализ показал, что C2H2-домены 1–3 и 7–9 связываются с двумя участками (C- и A-боксы) в ICR-эlemente, при этом центральные C2H2-домены участвуют в специфичном связывании с 5S РНК [167]. Отсутствие гомологии в аминокислотной последовательности TFIIIA-белков из разных видов предполагает параллельную эволюцию последовательностей промотора, 5S РНК и C2H2-доменов, которые участвуют в специфичном связывании ДНК и РНК. Белок TFIIIA определяет открытый хроматин на промоторе, а TAS-домен участвует в рекрутировании и стабильном связывании с промотором TFIIIB-комплекса [168].

Таким образом, в число C2H2-белков входят, помимо CTCF, и другие белки, которые могут выполнять архитектурную функцию, но они мало изучаются. Многие белки участвуют в активации или репрессии транскрипции, определены сайты связывания в открытом хроматине, получены примеры организации локальных петель на уровне отдельных генов. Однако не хватает структурированных полногеномных исследований, направленных на детальное описание роли этих белков в организации архитектуры хромосом.

С2Н2-БЕЛКИ ДРОЗОФИЛЫ: РАЗНЫЕ СТРУКТУРЫ, СХОДНЫЕ СВОЙСТВА

В геноме дрозофилы найдено порядка 170 белков с кластерами, состоящими из пяти и более С2Н2-доменов. Однако к настоящему времени только для небольшой части этих белков получены данные по распределению сайтов их связывания в геноме и их функциональной роли в регуляции транскрипции генов и организации архитектуры хромосом (рис. 2). К наиболее хорошо изученным С2Н2-белкам относятся первый описанный у высших эукариот белок, обладающий инсуляторными свойствами, Su(Hw), и гомолог CTCF млекопитающих [22, 24, 169, 170]. Оба инсуляторных белка обладают сходным строением – содержат концевые неструктурированные домены и расположенный в центре кластер из 11 (dCTCF) или 12 (Su(Hw)) С2Н2-доменов. На N-конце белка dCTCF картирован неструктурированный глобулярный домен, способный формировать тетрамерные комплексы [68, 69], и потенциальный участок взаимодействия с когезиновым комплексом, имеющий гомологию с YxF-мотивом CTCF человека, взаимодействующим с комплексом SA2–SCC1 [71]. Интересная структурная особенность другого исследованного С2Н2-белка, Orbp [171], – наличие на N-конце атипичного цинкового пальца, способного к гомодимеризации (рис. 2). Orbp содержит кластер из пяти С2Н2-доменов, ответственных за специфичное связывание с ДНК, и дополнительных четырех С2Н2-доменов, которые могут участвовать во взаимодействиях с РНК и белками.

Остальные пять С2Н2-белков (M1BP, ZAF1, Pita, Zw5 и ZIPIC) относятся к большой группе ZAD-содержащих белков. ZAD (zinc-finger-associated domain)-домен найден у 98 белков дрозофилы, при этом около 70 из них содержат пять или более С2Н2-доменов [172, 173]. Обычно гены, кодирующие белки ZAD-С2Н2, расположены кластерами и, подобно белкам КРАВ-С2Н2 млекопитающих [174, 175], активно эволюционируют в результате множественных дупликаций исходных копий генов. Структура ZAD-доменов формируется двумя парами цистеинов, координируемых ионом цинка [176]. N-Концевая часть домена представляет собой глобулярную структуру, а С-концевой стебель сформирован длинной α-спиралью. Интересно, что ZAD-домены способны к гомодимеризации с формированием антипараллельного димера [176, 177].

Мутации в генах, кодирующих белки Pita и Zw5, вызывают эмбриональную летальность, что предполагает важную роль белков данного класса на ранних этапах развития дрозофилы [178, 179]. Инактивация белка Su(Hw) нарушает развитие гонад, что приводит к стерильности самок [180]. Как и у млекопи-

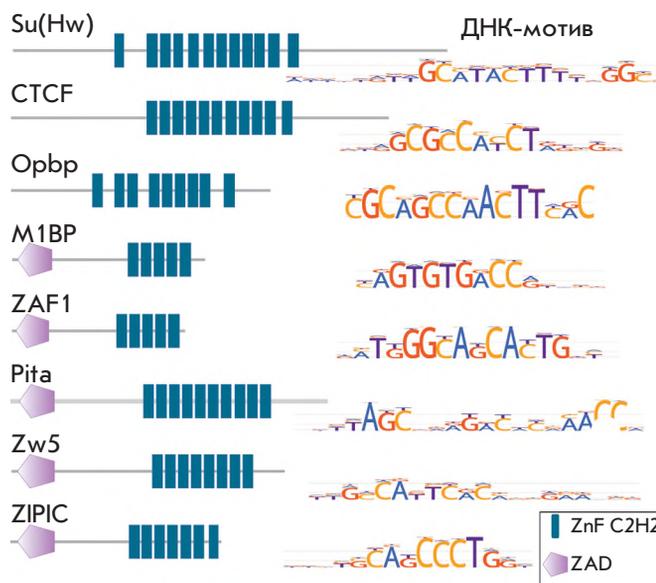


Рис. 2. С2Н2-белки дрозофилы с архитектурными функциями. Показаны доменная организация известных архитектурных белков дрозофилы и их мотивы связывания

тающих, белок CTCF дрозофилы участвует в регуляции экспрессии *hox*-генов [181, 182]. Несмотря на то что в геноме дрозофилы найдено только около 40 сайтов связывания белка Orbp, его инактивация приводит к летальности на стадии куколки [171].

Все исследованные С2Н2-белки используют для связывания с длинными (12–15 п.н.) ДНК-мотивами (рис. 2) четыре-пять С2Н2-доменов, образующих кластер [171, 183–186]. За исключением Su(Hw) сайты связывания С2Н2-белков локализованы преимущественно в области промоторов активных генов и интронов [177, 184–190]. Наиболее показательным примером белка данного класса является M1BP, который связывается с промоторами более 2000 генов [185] и, согласно экспериментальным данным [191], участвует в наведении зон открытого хроматина и привлечении основного промоторного комплекса. Белок Orbp также связывается исключительно с промоторами генов и примерно в половине из них колокализуется с M1BP [171]. В отличие от других С2Н2-белков, вероятно, участвующих в активации экспрессии, Su(Hw), связываясь с промоторами большой группы нейрональных генов, репрессирует их транскрипцию в гонадах самок и на ранних стадиях развития дрозофилы [192, 193].

Роль С2Н2-белков в установлении дистанционных взаимодействий и блокировании активности энхансера проанализирована в трансгенных линиях дрозофилы. *In vivo* С2Н2-белки эффективно взаимодействуют с искусственно синтезированными ДНК-

фрагментами, содержащими по четыре-пять сайтов связывания [177, 184, 188, 194]. В том случае, когда сайтами связывания С2Н2-белков окружен энхансер, происходит сильное блокирование его активности. Однако удаление любого из двух участков связывания С2Н2-белка восстанавливает активность энхансера, что доказывает важную роль взаимодействия между С2Н2-белками в процессе формирования петли хроматина, которая приводит к стерической изоляции энхансера. В трансгенной модельной системе сайты связывания С2Н2-белков способны сблизить дрожжевой GAL4-активатор и промотор репортерного гена, что приводит к активации транскрипции [177, 184, 195]. При этом комбинации сайтов связывания разных С2Н2-белков не способны сблизить GAL4-активатор с промотором [177, 195], что может объяснить значение предпочтительной гомодимеризации С2Н2-белков в обеспечении специфичных дистанционных взаимодействий между геномными элементами. Например, способность белков ZAF1 и ZIP1 поддерживать дистанционные взаимодействия определяется гомодимеризующимся ZAD-доменом [177, 184]. Таким образом, домены, обладающие способностью формировать гомодимеры, по всей видимости, играют важную роль в организации специфичных дистанционных взаимодействий между регуляторными элементами в хроматине.

Роль С2Н2-белков в организации границ регуляторных доменов наиболее наглядно можно продемонстрировать на примере bithorax-комплекса (BX-C), в состав которого входят три гомеозисных гена *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* [196, 197]. Регуляторная область BX-C делится на девять независимых доменов, каждый из которых активирует транскрипцию одного из трех гомеозисных генов в процессе развития. Несколько границ доменов детально охарактеризованы и картированы в виде минимальных фрагментов, способных функционировать как эффективные инсуляторы в трансгенных модельных системах [198–202]. Каждая охарактеризованная граница содержит в своем составе разные комбинации сайтов связывания белков Pita, dCTCF и Su(Hw), необходимых для ее функциональной активности [65, 66]. Границы могут быть заменены на мультиплицированные четыре-пять сайтов каждого из С2Н2-белков. Таким образом, несмотря на различия в структурной организации, белки Su(Hw), Pita или dCTCF имеют сходные функции и в процессе организации границ регуляторных доменов работают в кооперации друг с другом [66, 203, 204].

В отличие от млекопитающих, границы большинства ТАДов дрозофилы совпадают с кластерами генов «домашнего хозяйства» [205, 206]. Например, белок M1BP, сайты связывания которого локализованы

во многих промоторах генов «домашнего хозяйства», наиболее часто находят на границах ТАДов, тогда как сайты связывания других охарактеризованных С2Н2-белков обычно располагаются внутри ТАДов. В эмбрионах и эмбриональных клеточных линиях белок dCTCF, несмотря на когезинсвязывающий мотив, достаточно редко обнаруживается на границах ТАДов, при этом от 40 до 60% сайтов dCTCF колокализуются с когезиновыми комплексами на хроматине [205–207]. Связывание основной части когезина обнаруживается в зонах открытого хроматина активно транскрибируемых промоторов [208], поэтому нельзя исключить прямую или косвенную (наведение зон открытого хроматина) роль С2Н2-белков в привлечении когезиновых комплексов. Интересно, что в культуре клеток BG3, полученной из нервных тканей дрозофилы, большая часть границ ТАДов совпадает с сайтами связывания dCTCF [207]. Таким образом, границы ТАДов дрозофилы могут изменяться в процессе клеточной дифференцировки.

Наиболее вероятно, что границы ТАДов фиксируются благодаря взаимодействиям между белковыми комплексами, фланкирующими ТАД. Кроме того, на модели дрозофилы показано существование механизма формирования ТАДов за счет электростатических межнуклеосомных взаимодействий, в результате чего транскрипционно активные участки становятся своеобразными границами между ТАДами [116].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время С2Н2-белки высших эукариот остаются наименее изученным классом транскрипционных факторов. Хорошо исследованный белок CTCF млекопитающих дает общие представления о свойствах, партнерах и функциях транскрипционных факторов этого класса. CTCF, вероятно, является родоначальником всего класса С2Н2-белков, которые в процессе эволюции могли приобретать новые домены и связываться с новыми ДНК-последовательностями. В этом плане интересно то, что CTCF и у дрозофилы, и у млекопитающих участвует в организации границ транскрипционных доменов гомеозисных генов. На основании существующих результатов можно заключить, что С2Н2-белки у млекопитающих и дрозофилы часто участвуют в организации активных промоторов. Белки С2Н2, взаимодействуя с комплексами ремоделирования нуклеосом, могут формировать открытый хроматин и одновременно участвовать в привлечении основных транскрипционных факторов на промоторы. Многие хорошо исследованные регуляторные элементы, прежде всего промоторы и инсуляторы, содержат комбинации сайтов связывания С2Н2-белков, которые, взаимодействуя с хроматином, функциониру-

ют кооперативно. У части С2Н2-белков, в том числе СТСФ, идентифицированы N-концевые гомодимеризующиеся домены, которые могут быть вовлечены в организацию специфичных дистанционных взаимодействий. В настоящее время только в белке СТСФ найден мотив, с которым взаимодействует когезиновый комплекс. Однако С2Н2-белки, вероятно, способны взаимодействовать с другими поверхностями в когезиновых и конденсиновых комплексах, что согласуется с локализацией этих комплексов на активных промоторах.

Считается, что границы ТАДов и дистанционные взаимодействия у млекопитающих и дрозофилы формируются с помощью разных механизмов. Однако способен ли когезиновый комплекс млекопитающих активно выпетливать хроматин при формировании ТАДов и дистанционных взаимодействий между регуляторными элементами остается открытым вопросом. Также непонятно, почему аналогичный механизм не работает у других высших эукариот, несмотря на высокую степень консервативности когезинового комплекса. Интересно, что у рыбок данио на большей части границ ТАДов отсутствуют СТСФ и когезиновый комплекс [209], несмотря на то что СТСФ у данио и человека гомологичны на 86%. С другой стороны, СТСФ обнаружен на границах ТАДов в нервных клетках дрозофилы [207]. Можно предположить, что механизмы формирования ТАДов на самом деле намного более универсаль-

ны, чем кажется в настоящее время. Такие С2Н2-белки, как PRDM5 и ZNF143, могут стабилизировать связывание СТСФ с границами ТАДов млекопитающих и участвовать в дистанционных взаимодействиях. С2Н2-белки дрозофилы, связываясь в различных комбинациях с инсуляторами (например, в составе ВХ-С), позволяют двум идентичным копиям инсулятора поддерживать сверхдальние взаимодействия, т.е. по сути, формировать границы нового ТАДа. На границах ТАДов млекопитающих обычно находятся наиболее эволюционно консервативные кластеры СТСФ-сайтов [119]. Можно предположить, что на ранних этапах эволюции позвоночных размноженные копии одного или нескольких типов мобильных элементов, содержащих сайты связывания СТСФ в комбинации с сайтами других С2Н2-белков, организовывали дистанционные взаимодействия, часть из которых и привела к формированию ТАДов. Таким образом, несмотря на большой прогресс, достигнутый за последние годы в изучении пространственной организации генома и, в частности, архитектурной роли СТСФ, очень много вопросов остается без ответа из-за отсутствия данных о других участниках, необходимых для формирования архитектуры ядра. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда (проект 19-74-30026).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Spitz F, Furlong E.E. // Nature Reviews Genetics. 2012. V. 13. № 9. P. 613–626.
- Levine M., Cattoglio C., Tjian R. // Cell. 2014. V. 157. № 1. P. 13–25.
- Zabidi M.A., Stark A. // Trends Genet. 2016. V. 32. № 12. P. 801–814.
- Furlong E.E.M., Levine M. // Science. 2018. V. 361. № 6409. P. 1341–1345.
- Geyer P.K., Clark I. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. № 12. P. 2112–2127.
- West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G. // Genes Dev. 2002. V. 16. № 3. P. 271–288.
- Gerasimova T.I., Corces V.G. // Annu. Rev. Genet. 2001. V. 35. P. 193–208.
- 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. № 7. P. 1665–1680.
- Boettiger A., Murphy S. // Trends Genet. 2020. V. 36. № 4. P. 273–287.
- Boettiger A.N., Bintu B., Moffitt J.R., Wang S., Beliveau B.J., Fudenberg G., Imakaev M., Mirny L.A., Wu C.T., Zhuang X. // Nature. 2016. V. 529. № 7586. P. 418–422.
- Dekker J., Misteli T. // Cold Spring Harbor Perspectives Biol. 2015. V. 7. № 10. P. a019356.
- Sikorska N., Sexton T. // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. № 3. P. 653–664.
- Hansen A.S., Cattoglio C., Darzacq X., Tjian R. // Nucleus. 2018. V. 9. № 1. P. 20–32.
- 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.
- Zheng H., Xie W. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 9. P. 535–550.
- 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.
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. // Nature. 2012. V. 485. № 7398. P. 376–380.
- Nora E.P., Lajoie B.R., Schulz E.G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Pilot T., van Berkum N.L., Meisig J., Sedat J., et al. // Nature. 2012. V. 485. № 7398. P. 381–385.
- Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G. // Science Advances. 2019. V. 5. № 4. P. eaaw1668.
- Chang L.H., Ghosh S., Noordermeer D. // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. № 3. P. 643–652.
- Arzate-Mejia R.G., Recillas-Targa F., Corces V.G. // Development. 2018. V. 145. № 6. P. dev137729.
- Ali T., Renkawitz R., Bartkuhn M. // Curr. Opin. Genetics Dev. 2016. V. 37. P. 17–26.
- Braccioli L., de Wit E. // Essays Biochem. 2019. V. 63. № 1. P. 157–165.
- Chen D., Lei E.P. // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. V. 58. P. 61–68.
- Merkenschlager M., Nora E.P. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2016. V. 17. P. 17–43.
- Schmidt D., Schwalie P.C., Wilson M.D., Ballester B., Goncalves A., Kutter C., Brown G.D., Marshall A., Flicek P.,

- Odom D.T. // *Cell*. 2012. V. 148. № 1–2. P. 335–348.
27. Chen H., Tian Y., Shu W., Bo X., Wang S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. P. e41374.
28. Klug A. // *Quarterly Rev. Biophys.* 2010. V. 43. № 1. P. 1–21.
29. Persikov A.V., Wetzel J.L., Rowland E.F., Oakes B.L., Xu D.J., Singh M., Noyes M.B. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 3. P. 1965–1984.
30. Garton M., Najafabadi H.S., Schmitges F.W., Radovani E., Hughes T.R., Kim P.M. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 19. P. 9147–9157.
31. Persikov A.V., Singh M. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. 97–108.
32. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 18. P. 5978–5990.
33. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 3. P. 1156–1160.
34. Brayer K.J., Segal D.J. // *Cell Biochem. Biophys.* 2008. V. 50. № 3. P. 111–131.
35. Ryan R.F., Darby M.K. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 3. P. 703–709.
36. Crozatier M., Kongsuwan K., Ferrer P., Merriam J.R., Lengyel J.A., Vincent A. // *Genetics*. 1992. V. 131. № 4. P. 905–916.
37. Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure*. 2000. V. 29. P. 183–212.
38. Hashimoto H., Wang D., Horton J.R., Zhang X., Corces V.G., Cheng X. // *Mol. Cell*. 2017. V. 66. № 5. P. 711–720 e713.
39. Nakahashi H., Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // *Cell Reports*. 2013. V. 3. № 5. P. 1678–1689.
40. Xiao T., Wongtrakongate P., Trainor C., Felsenfeld G. // *Cell Reports*. 2015. V. 12. № 10. P. 1704–1714.
41. Xu D., Ma R., Zhang J., Liu Z., Wu B., Peng J., Zhai Y., Gong Q., Shi Y., Wu J., et al. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. № 14. P. 4020–4028.
42. Yin M., Wang J., Wang M., Li X., Zhang M., Wu Q., Wang Y. // *Cell Research*. 2017. V. 27. № 11. P. 1365–1377.
43. Liu Y., Zhang X., Blumenthal R.M., Cheng X. // *Trends Biochem. Sci.* 2013. V. 38. № 4. P. 177–183.
44. Hudson N.O., Buck-Koehn B.A. // *Molecules*. 2018. V. 23. № 10. P. 2555.
45. Ren G., Zhao K. // *Cell. Biosci.* 2019. V. 9. P. 83.
46. Noordermeer D., Feil R. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2020. V. 61. P. 17–24.
47. Heard E., Distèche C.M. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 14. P. 1848–1867.
48. Iuchi S. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. № 4. P. 625–635.
49. Hall T.M. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. V. 15. № 3. P. 367–373.
50. Saldana-Meyer R., Gonzalez-Buendia E., Guerrero G., Narendra V., Bonasio R., Recillas-Targa F., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 7. P. 723–734.
51. Kung J.T., Kesner B., An J.Y., Ahn J.Y., Cifuentes-Rojas C., Colognori D., Jeon Y., Szanto A., del Rosario B.C., Pinter S.F., et al. // *Mol. Cell*. 2015. V. 57. № 2. P. 361–375.
52. Hansen A.S., Hsieh T.S., Cattoglio C., Pustova I., Saldana-Meyer R., Reinberg D., Darzacq X., Tjian R. // *Mol. Cell*. 2019. V. 76. № 3. P. 395–411 e313.
53. Shukla S., Kavak E., Gregory M., Imashimizu M., Shutinoski B., Kashlev M., Oberdoerffer P., Sandberg R., Oberdoerffer S. // *Nature*. 2011. V. 479. № 7371. P. 74–79.
54. Marina R.J., Sturgill D., Bailly M.A., Thenoz M., Varma G., Prigge M.F., Nanan K.K., Shukla S., Haque N., Oberdoerffer S. // *EMBO*. 2016. V. 35. № 3. P. 335–355.
55. Nanavaty V., Abrash E.W., Hong C., Park S., Fink E.E., Li Z., Sweet T.J., Bhasin J.M., Singuri S., Lee B.H., et al. // *Mol. Cell*. 2020. V. 78. № 4. P. 752–764 e756.
56. Chernukhin I., Shamsuddin S., Kang S.Y., Bergstrom R., Kwon Y.W., Yu W., Whitehead J., Mukhopadhyay R., Docquier F., Farrar D., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 5. P. 1631–1648.
57. Heger P., Marin B., Schierenberg E. // *BMC Mol. Biol.* 2009. V. 10. P. 84.
58. Heger P., Marin B., Bartkuhn M., Schierenberg E., Wiehe T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 43. P. 17507–17512.
59. Moon H., Filippova G., Loukinov D., Pugacheva E., Chen Q., Smith S.T., Munhall A., Grewe B., Bartkuhn M., Arnold R., et al. // *EMBO Reports*. 2005. V. 6. № 2. P. 165–170.
60. 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.
61. Kadota M., Hara Y., Tanaka K., Takagi W., Tanegashima C., Nishimura O., Kuraku S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4957.
62. Narendra V., Rocha P.P., An D., Raviram R., Skok J.A., Mazzoni E.O., Reinberg D. // *Science*. 2015. V. 347. № 6225. P. 1017–1021.
63. Savitsky M., Kim M., Kravchuk O., Schwartz Y.B. // *Genetics*. 2016. V. 202. № 2. P. 601–617.
64. Luo H., Wang F., Zha J., Li H., Yan B., Du Q., Yang F., Sobh A., Vulpe C., Drusbosky L., et al. // *Blood*. 2018. V. 132. № 8. P. 837–848.
65. Kyrchanova O., Zolotarev N., Mogila V., Maksimenko O., Schedl P., Georgiev P. // *Development*. 2017. V. 144. № 14. P. 2663–2672.
66. Kyrchanova O., Maksimenko O., Ibragimov A., Sokolov V., Postika N., Lukyanova M., Schedl P., Georgiev P. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 13. P. eaaz3152.
67. Schwalie P.C., Ward M.C., Cain C.E., Faure A.J., Gilad Y., Odom D.T., Flicek P. // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 12. P. R148.
68. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., Boyko K., Popov V., Maksimenko O., Georgiev P. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 2677.
69. Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., Ivlieva T., Mogila V., Deshpande G., Wolle D., Schedl P., Georgiev P. // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 63.
70. Nishana M., Ha C., Rodriguez-Hernaez J., Ranjbaran A., Chio E., Nora E.P., Badri S.B., Kloetgen A., Bruneau B.G., Tsigos A., et al. // *Genome Biol.* 2020. V. 21. № 1. P. 108.
71. Li Y., Haarhuis J.H.I., Sedeno 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.
72. Xiao T., Wallace J., Felsenfeld G. // *Mol. Cell Biol.* 2011. V. 31. № 11. P. 2174–2183.
73. Zlatanova J., Caiafa P. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. № Pt 9. P. 1275–1284.
74. Marino M.M., Rega C., Russo R., Valletta M., Gentile M.T., Esposito S., Baglivo I., De Feis I., Angelini C., Xiao T., et al. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 3. P. 861–873.
75. 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.
76. 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 e922.
77. Yao H., Brick K., Evrard Y., Xiao T., Camerini-Otero R.D., Felsenfeld G. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 22. P. 2543–2555.
78. Uskula-Reimand L., Hou H., Samavarchi-Tehrani P.,

- Rudan M.V., Liang M., Medina-Rivera A., Mohammed H., Schmidt D., Schwalie P., Young E.J., et al. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 182.
79. Gittens W.H., Johnson D.J., Allison R.M., Cooper T.J., Thomas H., Neale M.J. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4846.
80. Jantz D., Berg J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 20. P. 7589–7593.
81. Dovat S., Ronni T., Russell D., Ferrini R., Cobb B.S., Smale S.T. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 23. P. 2985–2990.
82. Rizkallah R., Alexander K.E., Hurt M.M. // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. № 19. P. 3327–3336.
83. Luo H., Yu Q., Liu Y., Tang M., Liang M., Zhang D., Xiao T.S., Wu L., Tan M., Ruan Y., et al. // *Science Adv.* 2020. V. 6. № 8. P. eaaw4651.
84. Caiafa P., Zlatanova J. // *J. Cell. Physiol.* 2009. V. 219. № 2. P. 265–270.
85. Farrar D., Rai S., Chernukhin I., Jagodic M., Ito Y., Yammine S., Ohlsson R., Murrell A., Klenova E. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. № 5. P. 1199–1216.
86. Pavlaki I., Docquier F., Chernukhin I., Kita G., Gretton S., Clarkson C.T., Teif V.B., Klenova E. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2018. V. 1861. № 8. P. 718–730.
87. Torrano V., Navascues J., Docquier F., Zhang R., Burke L.J., Chernukhin I., Farrar D., Leon J., Berciano M.T., Renkawitz R., et al. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. Pt 9. P. 1746–1759.
88. Wang A.J., Han Y., Jia N., Chen P., Minden M.D. // *Leukemia.* 2020. V. 34. № 5. P. 1278–1290.
89. MacPherson M.J., Beatty L.G., Zhou W., Du M., Sadowski P.D. // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. № 3. P. 714–725.
90. Golovnin A., Volkov I., Georgiev P. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. № Pt 8. P. 2064–2074.
91. Rosonina E., Akhter A., Dou Y., Babu J., Sri Theivakadacham V.S. // *Transcription.* 2017. V. 8. № 4. P. 220–231.
92. Wallace J.A., Felsenfeld G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007. V. 17. № 5. P. 400–407.
93. Barkess G., West A.G. // *Epigenomics.* 2012. V. 4. № 1. P. 67–80.
94. Ghirlando R., Felsenfeld G. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 8. P. 881–891.
95. Farrell C.M., West A.G., Felsenfeld G. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 11. P. 3820–3831.
96. West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D., Felsenfeld G. // *Mol. Cell.* 2004. V. 16. № 3. P. 453–463.
97. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A.G. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 1. P. e1000804.
98. Gowher H., Brick K., Camerini-Otero R.D., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 7. P. 2370–2375.
99. Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L.A. // *Cell Reports.* 2016. V. 15. № 9. P. 2038–2049.
100. Nishiyama T. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019. V. 58. P. 8–14.
101. Morales C., Losada A. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018. V. 52. P. 51–57.
102. 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.
103. 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.
104. Pugacheva E.M., Kubo N., Loukinov D., Tajmul M., Kang S., Kovalchuk A.L., Strunnikov A.V., Zentner G.E., Ren B., Lobanenkov V.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 4. P. 2020–2031.
105. 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 e324.
106. 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.* 2017. V. 36. № 24. P. 3573–3599.
107. Ladurner R., Bhaskara V., Huis in 't Veld P.J., Davidson I.F., Kreidl E., Petzold G., Peters J.M. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 19. P. 2228–2237.
108. Elbatsh A.M.O., Haarhuis J.H.I., Petela N., Chapard C., Fish A., Celie P.H., Stadnik M., Ristic D., Wyman C., Medema R.H., et al. // *Mol. Cell.* 2016. V. 61. № 4. P. 575–588.
109. Vian L., Pekowska A., Rao S.S.P., Kieffer-Kwon K.R., Jung S., Baranello L., Huang S.C., El Khattabi L., Dose M., Pruett N., et al. // *Cell.* 2018. V. 175. № 1. P. 292–294.
110. Vietri Rudan M., Barrington C., Henderson S., Ernst C., Odom D.T., Tanay A., Hadjur S. // *Cell Rep.* 2015. V. 10. № 8. P. 1297–1309.
111. de Wit E., Vos E.S., Holwerda S.J., Valdes-Quezada C., Versteegen M.J., Teunissen H., Splinter E., Wijchers P.J., Krijger P.H., de Laat W. // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. № 4. P. 676–684.
112. Guo Y., Xu Q., Canzio D., Shou J., Li J., Gorkin D.U., Jung I., Wu H., Zhai Y., Tang Y., et al. // *Cell.* 2015. V. 162. № 4. P. 900–910.
113. Davidson I.F., Bauer B., Goetz D., Tang W., Wutz G., Peters J.M. // *Science.* 2019. V. 366. № 6471. P. 1338–1345.
114. Kim Y., Shi Z., Zhang H., Finkelstein I.J., Yu H. // *Science.* 2019. V. 366. № 6471. P. 1345–1349.
115. Stigler J., Camdere G.O., Koshland D.E., Greene E.C. // *Cell Rep.* 2016. V. 15. № 5. P. 988–998.
116. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov 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.
117. Luzhin A.V., Flyamer I.M., Khrameeva E.E., Ulianov S.V., Razin S.V., Gavrilov A.A. // *J. Cell. Biochem.* 2019. V. 120. № 3. P. 4494–4503.
118. Holzmann J., Politi A.Z., Nagasaka K., Hantsche-Grininger M., Walther N., Koch B., Fuchs J., Durnberger G., Tang W., Ladurner R., et al. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e46269.
119. Kentepozidou E., Aitken S.J., Feig C., Stefflova K., Ibarra-Soria X., Odom D.T., Roller M., Flicek P. // *Genome Biol.* 2020. V. 21. № 1. P. 5.
120. 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 e614.
121. Gassler J., Brandao H.B., Imakaev M., Flyamer I.M., Ladstatter S., Bickmore W.A., Peters J.M., Mirny L.A., Tachibana K. // *EMBO J.* 2017. V. 36. № 24. P. 3600–3618.
122. Zhang H., Emerson D.J., Gilgenast T.G., Titus K.R., Lan Y., Huang P., Zhang D., Wang H., Keller C.A., Giardine B., et al. // *Nature.* 2019. V. 576. № 7785. P. 158–162.
123. Owens N., Papadopoulou T., Festuccia N., Tachtsidi A., Gonzalez I., Dubois A., Vandormael-Pournin S., Nora E.P., Bruneau B.G., Cohen-Tannoudji M., et al. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e47898.
124. Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. // *Cell.* 2018. V. 172. № 4. P. 650–665.
125. Lambert S.A., Yang A.W.H., Sasse A., Cowley G., Albu M., Caddick M.X., Morris Q.D., Weirauch M.T., Hughes T.R. // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 6. P. 981–989.

126. Imbeault M., Helleboid P.Y., Trono D. // *Nature*. 2017. V. 543. № 7646. P. 550–554.
127. Schmitges F.W., Radovani E., Najafabadi H.S., Barazandeh M., Campitelli L.F., Yin Y., Jolma A., Zhong G., Guo H., Kanagalingam T., et al. // *Genome Res*. 2016. V. 26. № 12. P. 1742–1752.
128. Barazandeh M., Lambert S.A., Albu M., Hughes T.R. // *G3 (Bethesda)*. 2018. V. 8. № 1. P. 219–229.
129. Platt R.N., 2nd, Vandeweghe M.W., Ray D.A. // *Chromosome Research*. 2018. V. 26. № 1–2. P. 25–43.
130. Bruno M., Mahgoub M., Macfarlan T.S. // *Annu. Rev. Genet.* 2019. V. 53. P. 393–416.
131. Emerson R.O., Thomas J.H. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 22. P. 12043–12052.
132. Okumura K., Sakaguchi G., Naito K., Tamura T., Igarashi H. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 24. P. 5025–5032.
133. Rohrmoser M., Kluge M., Yahia Y., Gruber-Eber A., Maqbool M.A., Forne I., Krebs S., Blum H., Greifengberg A.K., Geyer M., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № 2. P. 700–715.
134. Diehl A.G., Ouyang N., Boyle A.P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1796.
135. Herz H.M., Garruss A., Shilatifard A. // *Trends in Biochemical Sciences*. 2013. V. 38. № 12. P. 621–639.
136. Maeda T. // *Int. J. Hematol.* 2016. V. 104. № 3. P. 310–323.
137. Al Chiblak M., Steinbeck F., Thiesen H.J., Lorenz P. // *BMC Molecular and Cell Biology*. 2019. V. 20. № 1. P. 60.
138. Schumacher C., Wang H., Honer C., Ding W., Koehn J., Lawrence Q., Coulis C.M., Wang L.L., Ballinger D., Bowen B.R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 17173–17179.
139. Yang P., Wang Y., Macfarlan T.S. // *Trends Genet.* 2017. V. 33. № 11. P. 871–881.
140. Francis M., Cheng H., Ma P., Grider A. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2019. V. 192. № 2. P. 83–90.
141. Ogo O.A., Tyson J., Cockell S.J., Howard A., Valentine R.A., Ford D. // *Mol. Cell Biol.* 2015. V. 35. № 6. P. 977–987.
142. Kino T., Pavlatou M.G., Moraitis A.G., Nemery R.L., Raygada M., Stratakis C.A. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 97. № 8. P. E1557–1566.
143. Fadda A., Syed N., Mackeh R., Papadopoulou A., Suzuki S., Jithesh P.V., Kino T. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 41598.
144. Wagner S., Hess M.A., Ormonde-Hanson P., Malandro J., Hu H., Chen M., Kehrler R., Frodsham M., Schumacher C., Beluch M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 21. P. 15685–15690.
145. Fritze S., Lan X., Jin V.X., Farnham P.J. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 2. P. 1393–1403.
146. Brix D.M., Bundgaard Clemmensen K.K., Kallunki T. // *Cells*. 2020. V. 9. № 1. P. 223.
147. Galli G.G., Multhaupt H.A., Carrara M., de Lichtenberg K.H., Christensen I.B., Linnemann D., Santoni-Rugiu E., Calogero R.A., Lund A.H. // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 25. P. 3342–3350.
148. Noll L., Peterson F.C., Hayes P.L., Volkman B.F., Sander T. // *Leukemia Research*. 2008. V. 32. № 10. P. 1582–1592.
149. Peterson F.C., Hayes P.L., Waltner J.K., Heisner A.K., Jensen D.R., Sander T.L., Volkman B.F. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 363. № 1. P. 137–147.
150. Helleboid P.Y., Heusel M., Duc J., Piot C., Thorball C.W., Coluccio A., Pontis J., Imbeault M., Turelli P., Aebersold R., et al. // *EMBO*. 2019. V. 38. № 18. P. e101220.
151. Duan Z., Person R.E., Lee H.H., Huang S., Donadieu J., Badolato R., Grimes H.L., Papayannopoulou T., Horwitz M.S. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 19. P. 6889–6902.
152. Galli G.G., Carrara M., Francavilla C., de Lichtenberg K.H., Olsen J.V., Calogero R.A., Lund A.H. // *Mol. Cell Biol.* 2013. V. 33. № 22. P. 4504–4516.
153. Myslinski E., Krol A., Carbon P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 34. P. 21998–22006.
154. Schuster C., Myslinski E., Krol A., Carbon P. // *EMBO*. 1995. V. 14. № 15. P. 3777–3787.
155. Bailey S.D., Zhang X., Desai K., Aid M., Corradin O., Cowper-Sal Lari R., Akhtar-Zaidi B., Scacheri P.C., Haibe-Kains B., Lupien M. // *Nat. Commun.* 2015. V. 2. P. 6186.
156. Heidari N., Phanstiel D.H., He C., Grubert F., Jahanbani F., Kasowski M., Zhang M.Q., Snyder M.P. // *Genome Res*. 2014. V. 24. № 12. P. 1905–1917.
157. Myslinski E., Gerard M.A., Krol A., Carbon P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 52. P. 39953–39962.
158. Ngondo-Mbongo R.P., Myslinski E., Aster J.C., Carbon P. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 7. P. 4000–4014.
159. Schaub M., Krol A., Carbon P. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 10. P. 2114–2121.
160. Schaub M., Myslinski E., Krol A., Carbon P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 35. P. 25042–25050.
161. Sathyan K.M., McKenna B.D., Anderson W.D., Duarte F.M., Core L., Guertin M.J. // *Genes Dev.* 2019. V. 33. № 19–20. P. 1441–1455.
162. Mourad R., Cuvier O. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № 5. P. e27.
163. Wen Z., Huang Z.T., Zhang R., Peng C. // *Cell Biol. Toxicol.* 2018. V. 34. № 6. P. 471–478.
164. Yang Y., Zhang R., Singh S., Ma J. // *Bioinformatics*. 2017. V. 33. № 14. P. i252–i260.
165. Raab J.R., Chiu J., Zhu J., Katzman S., Kurukuti S., Wade P.A., Haussler D., Kamakaka R.T. // *EMBO*. 2012. V. 31. № 2. P. 330–350.
166. van Bortle K., Phanstiel D.H., Snyder M.P. // *Genome Biol.* 2017. V. 18. № 1. P. 180.
167. Layat E., Probst A.V., Tourmente S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1829. № 3–4. P. 274–282.
168. Smith D.R., Jackson I.J., Brown D.D. // *Cell*. 1984. V. 37. № 2. P. 645–652.
169. Matthews N.E., White R. // *BioEssays*. 2019. P. e1900048.
170. Schwartz Y.B., Cavalli G. // *Genetics*. 2017. V. 205. № 1. P. 5–24.
171. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O., Sokolinskaya E., Osadchiy I., Girardot C., Bonchuk A., Ciglar L., Furlong E.E.M., Georgiev P. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 21. P. 12285–12300.
172. Chung H.R., Schafer U., Jackle H., Bohm S. // *EMBO Reports*. 2002. V. 3. № 12. P. 1158–1162.
173. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 9. P. 1934–1943.
174. Mackeh R., Marr A.K., Fadda A., Kino T. // *Nuclear Receptor Signaling*. 2018. V. 15. P. 1550762918801071.
175. Ecco G., Imbeault M., Trono D. // *Development*. 2017. V. 144. № 15. P. 2719–2729.
176. Jauch R., Bourenkov G.P., Chung H.R., Urlaub H., Reidt U., Jackle H., Wahl M.C. // *Structure*. 2003. V. 11. № 11. P. 1393–1402.
177. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., Bonchuk A., Penin A.A., Lando A.S., Eliseeva I.A., Kulakovskiy I.V., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241.
178. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 16. P. 2098–2107.
179. Page A.R., Kovacs A., Deak P., Torok T., Kiss I., Dario P., Bastos C., Batista P., Gomes R., Ohkura H., et al. // *EMBO*. 2005. V. 24. № 24. P. 4304–4315.
180. Baxley R.M., Soshnev A.A., Koryakov D.E., Zhimulev I.F.,

- Geyer P.K. // *Dev. Biol.* 2011. V. 356. № 2. P. 398–410.
181. Mohan M., Bartkuhn M., Herold M., Philippen A., Heinl N., Bardenhagen I., Leers J., White R.A., Renkawitz-Pohl R., Saumweber H., et al. // *EMBO.* 2007. V. 26. № 19. P. 4203–4214.
182. Gambetta M.C., Furlong E.E.M. // *Genetics.* 2018. V. 210. № 1. P. 129–136.
183. Baxley R.M., Bullard J.D., Klein M.W., Fell A.G., Morales-Rosado J.A., Duan T., Geyer P.K. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4463–4478.
184. Maksimenko O., Kyrchanova O., Klimenko N., Zolotarev N., Elizarova A., Bonchuk A., Georgiev P. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2020. V. 1863. № 1. P. 194446.
185. Li J., Gilmour D.S. // *EMBO.* 2013. V. 32. № 13. P. 1829–1841.
186. 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.
187. Soshnev A.A., He B., Baxley R.M., Jiang N., Hart C.M., Tan K., Geyer P.K. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 12. P. 5415–5431.
188. 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.
189. 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. P. e1000814.
190. Negre 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.
191. Baumann D.G., Gilmour D.S. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 18. P. 10481–10491.
192. Soshnev A.A., Baxley R.M., Manak J.R., Tan K., Geyer P.K. // *Development.* 2013. V. 140. № 17. P. 3613–3623.
193. 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.
194. Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 7. P. e1003606.
195. Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 22. P. 7019–7028.
196. Maeda R.K., Karch F. // *Chromosoma.* 2015. V. 124. № 3. P. 293–307.
197. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., Magbanua J.P., White R., Georgiev P., Schedl P. // *Mech. Dev.* 2015. V. 138. Pt 2. P. 122–132.
198. Gruzdeva N., Kyrchanova O., Parshikov A., Kullyev A., Georgiev P. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 9. P. 3682–3689.
199. 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.
200. Iampietro C., Gummalla M., Muterio A., Karch F., Maeda R.K. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 12. P. e1001260.
201. Bender W., Lucas M. // *Genetics.* 2013. V. 193. № 4. P. 1135–1147.
202. Bowman S.K., Deaton A.M., Domingues H., Wang P.I., Sadreyev R.I., Kingston R.E., Bender W. // *eLife.* 2014. V. 3. P. e028333.
203. 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.
204. 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.
205. Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 188.
206. 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.
207. Chathoth K.T., Zabet N.R. // *Genome Res.* 2019. V. 29. № 4. P. 613–625.
208. Dorsett D. // *Trends Genet.* 2019. V. 35. № 7. P. 542–551.
209. Perez-Rico Y.A., Barillot E., Shkumatava A. // *iScience.* 2020. V. 23. № 5. P. 101046.

УДК 577.21 573.6

Мышечно-специфические промоторы для генной терапии

В. В. Скопенкова^{1,2,3*}, Т. В. Егорова^{1,2}, М. В. Бардина^{1,2,3}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²ООО «Марлин Биотех», Москва, 121205 Россия³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (ЦВРГТБ) ИБГ РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: v.silina.marlin@gmail.com

Поступила в редакцию 06.06.2020

Принята к печати 30.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11063

РЕФЕРАТ Современной стратегией лечения наследственных заболеваний, приводящих к патологии мышц, является заместительная генная терапия, при которой функциональную копию поврежденного гена доставляют в пораженные ткани с помощью вирусных векторов. Для этого необходимы также короткие регуляторные последовательности, которые обеспечивают устойчивую высокую экспрессию терапевтического гена в скелетных мышцах, диафрагме и сердце и имеют ограниченную активность в других тканях. В представленном обзоре рассмотрены этапы создания и совершенствования мышечно-специфических промоторов на основе генов α -скелетного актина, мышечной креатинкиназы, десмина и других генов, экспрессирующихся в мышцах. Описаны современные подходы к созданию синтетических мышечно-специфических промоторов, а также рассмотрены элементы вектора, способные (помимо промотора) влиять на экспрессию терапевтического гена. Приведены результаты клинических и доклинических исследований генотерапевтических препаратов с применением мышечно-специфических промоторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генная терапия, мышечно-специфические промоторы, ААВ, синтетические промоторы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ААВ – аденоассоциированный вирус; ДИ – доклинические исследования; КИ – клинические исследования; КПМД – конечностно-поясная мышечная дистрофия; НТО – нетранслируемая область; ТФ – фактор транскрипции; CMV – цитомегаловирус; MVM – мелкий вирус мышей; TSS – сайт начала транскрипции; TFBS – сайт связывания фактора транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Наследственные мышечные заболевания диагностируют у четырех-пяти человек на каждые 20000 населения [1]. К таким заболеваниям относят клинически и генетически гетерогенную группу мышечных дистрофий, врожденных миопатий, лизосомных болезней накопления, каналопатий и митохондриальных болезней, вызывающих поражения мышечной ткани. Слабость скелетной мускулатуры приводит к ограничению двигательной активности, нарушение работы глотательных мышц затрудняет самостоятельный прием пищи, а сердечная и дыхательная недостаточность требуют аппаратной поддержки и могут служить причиной ранней смерти. Лечение наследственных мышечных заболеваний носит по большей части симптоматический характер [2].

Многие наследственные мышечные заболевания обусловлены дефицитом определенного белка, вызванным мутацией в соответствующем гене (*таблица*). В качестве перспективной стратегии лечения таких заболеваний рассматривается *заместитель-*

ная генная терапия, т.е. доставка генетической конструкции с функциональной копией гена в мышечные ткани. В качестве инструмента для доставки генетических конструкций *in vivo* наиболее перспективны и безопасны рекомбинантные вирусные векторы, созданные на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ) [3]. Природные серотипы ААВ, такие, как ААВ9, ААВ8, ААВrh74, ААВ1 обладают естественным тропизмом к мышцам, что позволяет доставлять функциональную копию гена преимущественно в поврежденные ткани. В *таблице* приведены примеры разрабатываемых в настоящее время препаратов на основе ААВ для генной терапии наследственных мышечных заболеваний.

Эффективность генной терапии во многом определяется уровнем экспрессии гена интереса в целевых тканях. С одной стороны, мышцы являются удобной мишенью для генной терапии из-за продолжительной жизни мышечных волокон, доступности для внутримышечного введения, а также высокой способности к синтезу белка [12]. С другой стороны, мышцы

Наследственные мышечные заболевания и разрабатываемые препараты генной терапии

Заболевание	Ген, мутация	Тип наследования	Белок	Препараты генной терапии* в клинических и доклинических испытаниях
Миодистрофия Дюшенна	<i>DMD</i>	ХР	Дистрофин	КИ: AAVrh74.MHCK7.miDMD NCT03769116 КИ: AAV9.CK8e.miDMD NCT03368742 КИ: AAV9.tMCK.miDMD NCT04281485
Болезнь Данона	<i>LAMP2</i>	ХР	LAMP2	ДИ: AAV9.CAG.LAMP2B [4] КИ: NCT03882437
Синдром Барта	<i>TAZ</i>	ХР	Тафаззин	ДИ: AAV9.Des.TAZ [5]
Миотубулярная миопатия	<i>MTM1</i>	ХР	Миотубулярин	ДИ: AAV8.DES.hMTM1 [6] КИ: NCT03199469
Первичный дефицит мерозина	<i>LAMA2</i>	АР	Мерозин	ДИ: AAV9.CB.mini-agrin [7]
Болезнь Помпе	<i>GAA</i>	АР	α -1,4-глюкозидаза	ДИ: AAV2/8.MHCK7.hGAA [8] КИ: AAV2/8.LSP.hGAA NCT03533673 КИ: rAAV9.DES.hGAA NCT02240407
Конечно-поясная мышечная дистрофия (КПМД), 2А	<i>CAPN3</i>	АР	Кальпаин 3	ДИ: AAV9.desmin.hCAPN3 [9]
КПМД, 2В	<i>DYSF</i>	АР	Дисферлин	КИ: rAAVrh.74.MHCK7.DYSF NCT02710500
КПМД, 2D	<i>SGCA</i>	АР	α -саркогликан	КИ: rAAV1.tMCK.haSG NCT00494195 КИ: scAAVrh74.tMCK.hSGCA NCT01976091
КПМД, 2Е	<i>SGCB</i>	АР	β -саркогликан	КИ: scAAVrh74.MHCK7.hSGCB NCT03652259
КПМД, 2I	<i>FKRP</i>	АР	Фукутин-подобный белок	ДИ: AAV9.Des.mFkrp [10]
Окулофарингеальная миодистрофия	<i>PABPN1</i>	АД	PABPN1	ДИ: AAV9.spc512.PABPN1 [11]

* В названии препаратов указан серотип вектора ААВ, промотор и ген интереса.

Примечание. АД – аутосомно-доминантный, АР – аутосомно-рецессивный, ХР – Х-сцепленный, рецессивный, ДИ – доклинические исследования, КИ – клинические исследования.

составляют до 30–40% массы тела, что требует высоких доз генотерапевтического препарата [13]. Кроме того, мышечная ткань разнородна по своей структуре и подразделяется на сердечную, скелетную и гладкую мускулатуру. Это затрудняет создание препаратов, способных одинаково эффективно работать в разных типах мышечной ткани [14].

Правильно выбранный промотор для регуляции экспрессии гена интереса – залог успешной генной терапии. Такой промотор должен обеспечивать стабильную, высокую экспрессию функциональной копии гена в пораженных мышцах в течение длительного периода и обладать при этом ограниченной активностью в других тканях. При использовании ААВ в качестве вектора для генной терапии также необходимо уменьшить размер промотора из-за небольшой емкости вируса (4.7 т.п.н.) [3]. Сильные и конститутивные промоторы, такие, как промоторы респираторно-синцитиального вируса (RSV), цитомегаловируса (CMV) или фактора элонгации

1a (EF1a), имеют небольшой размер и могут применяться для достижения высоких уровней экспрессии. Однако экспрессия в нецелевых клетках, особенно в антигенпрезентирующих, приводит к активации клеточного и гуморального иммунного ответа [15]. Кроме того, вирусные промоторы быстро метилируются в трансдуцированных клетках, что приводит к снижению их активности [16].

В нашем обзоре описаны принципы создания и совершенствования природных мышечно-специфических промоторов, современные подходы к дизайну синтетических промоторов, а также их применение в генотерапевтических конструкциях.

СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА

Транскрипция генов эукариот управляется регуляторными элементами двух классов: промоторами, в структуре которых можно выделить коровую и проксимальные части, и дистальными регуляторными элементами (рис. 1) [17].

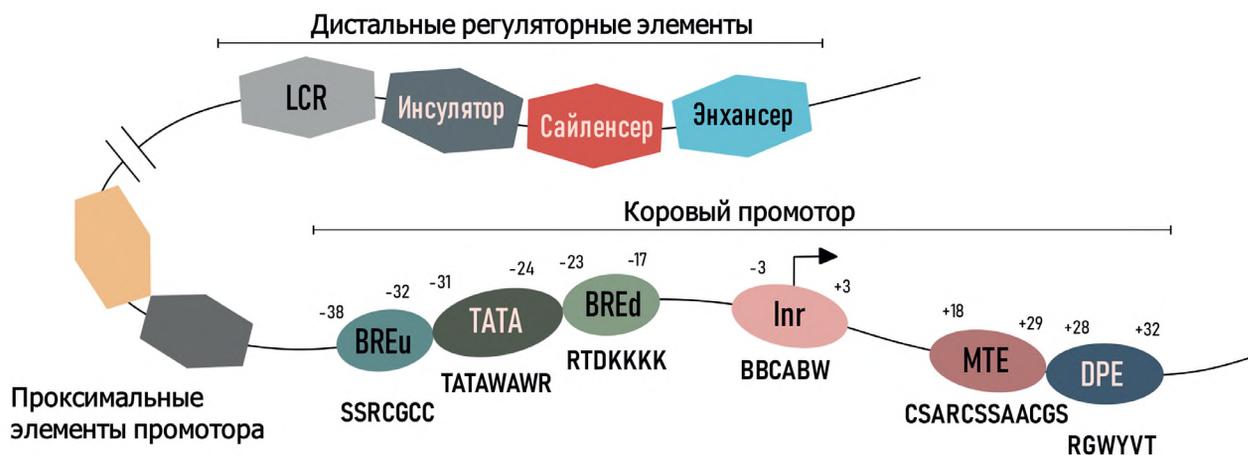


Рис. 1. Структура эукариотического промотора. Промотор эукариот представлен коровым промотором, проксимальными элементами, а также дистальными регуляторными элементами. Показаны консервативные элементы корового промотора, их последовательность и положение от сайта начала транскрипции

Коровый (базальный, минимальный) промотор – участок ДНК, который расположен в положении примерно $-50... +50$ нуклеотидов относительно начального сайта транскрипции (TSS) и отвечает за инициацию транскрипции [18]. Выделяют несколько типов коровых промоторов. В «сфокусированном» коровом промоторе присутствует один хорошо различимый TSS. Если в области $50-100$ нуклеотидов присутствует большое количество близко расположенных TSS, то такой коровый промотор называют «дисперсным» [19]. Промоторы сфокусированного типа встречаются преимущественно в генах с тканеспецифичной экспрессией, тогда как дисперсные коровые промоторы характерны для повсеместно экспрессирующихся генов [18].

На коровом промоторе происходит сборка преинициаторного комплекса, который состоит из РНК-полимеразы II и базальных факторов транскрипции (ТФ). Коровые промоторы содержат различные консервативные мотивы, которые определяют их свойства (рис. 1). Наиболее распространенным элементом коровых промоторов является инициатор (Inr) – последовательность нуклеотидов, которая окружает TSS и узнается мультисубъединичным транскрипционным фактором IID (TFIID) [20]. Другой распространенный элемент корового промотора – TATA-бокс. TATA-подобную последовательность содержит 28% сфокусированных промоторов человека [19]. TATA-бокс узнается субъединицей ТВР транскрипционного фактора TFIID [21]. В промоторах без TATA-бокса Inr часто сопровождается мотивом DPE (downstream promoter element), который расположен после инициатора и также распознается субъединицами TFIID [22]. MTE (motif ten element) располагается близко или перекрывается с DPE-элементом [23]. В коровых промоторах также часто встречаются такие элемен-

ты, как BREu (upstream TFIIB recognition element) и BREd (downstream TFIIB recognition element) [24].

Проксимальная часть промотора составляет $\sim 50-1000$ п.н. и содержит множество сайтов связывания транскрипционных факторов (TFBS, transcription factor binding site) [25]. Именно уникальные сочетания таких сайтов связывания для каждого промотора позволяют всего ~ 1600 ТФ управлять экспрессией ~ 25000 генов человека, контролируя время, место и продолжительность экспрессии каждого из них [26].

К дистальным регуляторным элементам генов эукариот относятся энхансеры, сайленсеры, инсуляторы и области контроля локуса (LCR) (рис. 1). Наибольший интерес для данного обзора представляют энхансерные элементы – последовательности ДНК длиной $\sim 100-1000$ п.н., которые могут усиливать транскрипцию генов независимо от ориентации и расстояния до целевого промотора [27]. Эти элементы могут быть найдены в 5'- и 3'-нетранслируемых областях (НТО) генов, в пределах экзонов и интронов, и даже на расстоянии до 1 млн п.н. от TSS [28]. Многие из энхансеров являются высококонсервативными последовательностями, активность которых может быть ограничена конкретным типом ткани или клеток, этапом развития или определенными физиологическими условиями [25].

ПРИРОДНЫЕ ПРОМОТОРЫ

Простой путь создания мышечно-специфического промотора основан на использовании природного промотора гена, активно экспрессирующегося в мышцах. Полноразмерный природный промотор укорачивают, оставляя коровый и проксимальный промоторы, добавляя дистальные энхансеры [29]. Вносимые делеции обычно затрагивают низкоконсервативные последовательности. Значимость остав-

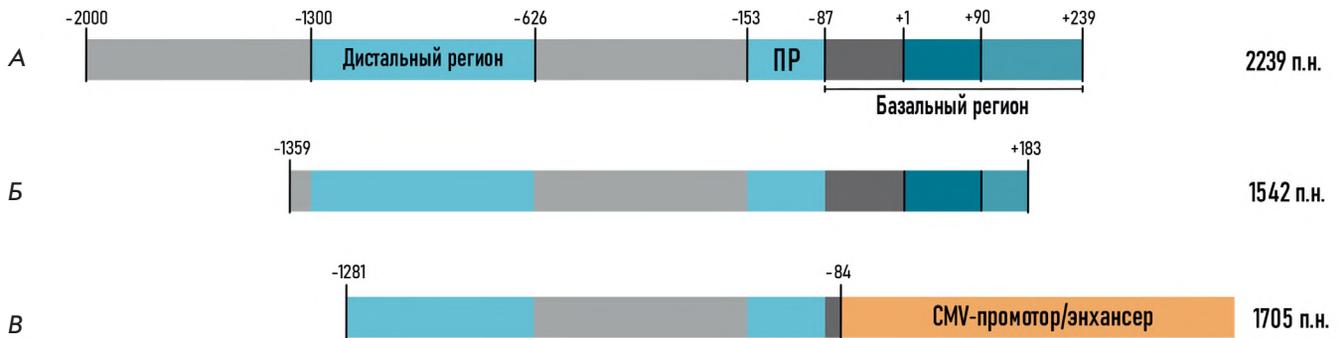


Рис. 2. Промоторы на основе гена *ACTA1/HSA*. *A* – полноразмерный HSA-промотор содержит дистальный регион, проксимальный регион (ПР) и базальный, который состоит из некодирующего экзона (+1...+90) и фрагмента первого интрона (+91...+239); *Б* – HSA-промотор с внесенными делециями; *В* – химерный HSA/CMV-промотор, состоящий из фрагмента промотора HSA и CMV-промотора

ленных последовательностей для экспрессии подтверждают мутационным анализом [29]. В других случаях создают гибридные/химерные промоторы, добавляя энхансеры других генов [30]. Варьируя количество копий энхансеров и отдельных TFBS, рационально комбинируя эти последовательности, можно добиться значительного увеличения уровня экспрессии и тканеспецифичности промотора [31].

Промоторы на основе гена α -скелетного актина

Для создания мышечно-специфических промоторов исследователи в первую очередь обратились к изучению промоторных областей генов, экспрессирующихся в миоцитах. Актин является одним из основных белков саркомера – базовой сократительной единицы поперечно-полосатых мышц. У высших позвоночных выделяют шесть основных изоформ актина, кодируемых шестью разными генами: α -скелетный, α -сердечный актин, α -гладкомышечный, γ -гладкомышечный, а также две повсеместно экспрессирующиеся немышечные изоформы – β -цитоплазматический и γ -цитоплазматический актин [32]. Наибольший интерес вызывал промотор гена α -скелетного актина человека (*HSA*, human α -skeletal actin), так как во взрослых мышцах среди актиновых белков преобладает эта изоформа [33].

Первые работы показали, что область размером 2000 п.н. перед геном *HSA*, а также первый экзон и фрагмент первого интрона необходимы и достаточны для мышечно-специфической экспрессии в культуре клеток (рис. 2А) [34]. В промоторе выделили три главных региона: дистальный (–1300...–626 п.н. от TSS), проксимальный (–153...–87) и базальный (–87...+239), которые обеспечивали тканеспецифическую экспрессию, если разместить их (вместе или по отдельности) перед промотором SV40 [34].

Фрагмент –2000...+7500 п.н. гена *HSA* (промоторный регион –2000...+239) использовали для создания трансгенной линии мышей (рис. 2А) [35]. С исполь-

зованием данного промотора впервые было показано, что уровни экспрессии трансгена и эндогенного α -скелетного актина в поперечно-полосатых мышцах мыши сопоставимы. Промотор HSA стал довольно популярным, его использовали в большом числе исследований. Так, этот промотор применяли для создания трансгенных мышечей с делециями гена дистрофина [36], мышечей со сверхэкспрессией дисферлина [37], моделей мышечей со спинальной мышечной атрофией [38], а также для доставки микродистрофина в мышцы мышечей с помощью лентивирусных векторов [39].

Укороченную модификацию промотора HSA человека использовали в векторе AAB для лечения миодистрофии Дюшенна [40]. Высокий уровень экспрессии трансгена в мышцах обеспечивали с помощью фрагмента длиной 1542 п.н., состоящего из дистального региона, промотора, а также части первого интрона (рис. 2Б). Трансген активно экспрессировался в скелетных мышцах и сердце, но отсутствовал в печени.

Химерный промотор HSA/CMV использовали для продукции в мышцах фактора свертываемости крови IX при гемофилии В [41]. Этот промотор представлял собой фрагмент промотора HSA (–1281...–84), сшитого с CMV-промотором (рис. 2В). В культуре клеток миобластов химерный промотор превосходил по уровню экспрессии CMV-промотор и полноразмерный промотор HSA, однако был столь же активен, как и CMV-промотор в немышечных культурах клеток. По-видимому, добавление повсеместно экспрессирующегося CMV-промотора хотя и увеличило активность химерного промотора, однако лишило его тканевой специфичности.

Для создания мышечно-специфических промоторов по аналогии с промотором HSA были модифицированы регуляторные области гомологичных генов курицы [42], крысы [43] и быка [44]. Полученные конструкции успешно применяли в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также для создания трансгенных мышечей.

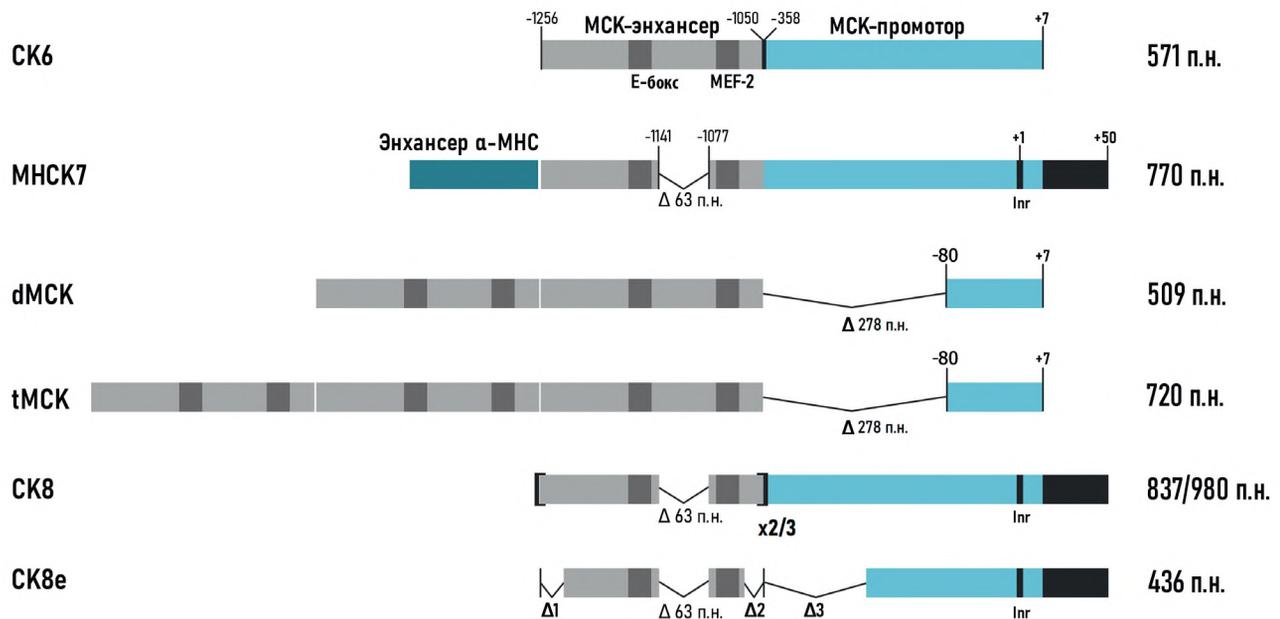


Рис. 3. Промоторы на основе гена *Msk*. Все конструкции содержат в себе энхансер *MCK* и промотор *MCK* с различными внесенными изменениями

В целом, промоторы α-скелетного актина проявляют высокий уровень и специфичность экспрессии в мышечных клетках, однако из-за большого размера они реже используются в настоящее время.

Промоторы на основе гена мышечной креатинкиназы

Второй наиболее часто встречающейся мРНК в скелетных мышцах является транскрипт гена мышечной креатинкиназы (*MCK/CKM*, creatine kinase, M-type) [45]. Мышечная креатинкиназа катализирует обратимый перенос фосфорильного остатка с АТФ на креатин и с креатинфосфата на АДФ, обеспечивая тем самым энергией мышечные сокращения. Ген *MCK* также проявляет высокую активность в сердечной мышце, и его транскрипция активируется в ходе дифференцировки миобластов в миоциты [46].

Промотор гена *MCK* хорошо охарактеризован *in vitro* и *in vivo*. В число основных регуляторных областей гена *Msk* мышцы входит мышечно-специфический (206 п.н.) энхансер, расположенный в регионе -1256...-1050 [47]. Этот энхансер функционирует независимо от ориентации и содержит ряд мотивов для связывания миогенных ТФ, а именно, E-боксы, CarG, MEF-2-сайты. Мутационный анализ этих мотивов подтвердил их значение для мышечно-специфической экспрессии [48].

Другой ключевой регуляторный элемент этого гена – проксимальный промотор 358 п.н. [47]. Так, один этот промотор обеспечивал высокий уровень экспрессии трансгена в мышцах конечностей

и брюшных скелетных мышцах мышей, но был неактивен в мышцах сердца и языка. Тем не менее, когда соединили энхансер (206 п.н.) и промотор (358 п.н.), то экспрессия восстановилась во всех типах мышц [47]. Данные, полученные на трансгенных мышцах, подтвердили необходимость энхансера для запуска экспрессии в сердце [49].

На основе перечисленных регуляторных последовательностей созданы и протестированы серии небольших *MCK*-кассет для аденовирусных векторов [50]. Так, **SK6-конструкция**, которая состояла из энхансера 206 п.н. и проксимального промотора 358 п.н. (рис. 3), обеспечивала высокую мышечную специфичность. Однако уровень экспрессии в мышцах не превышал 12% по сравнению с аналогичной конструкцией с CMV-промотором, экспрессия в сердце оставалась низкой [50].

Чтобы добиться высокого уровня экспрессии трансгена в сердечной мышце, был сконструирован химерный промотор **MNCK7** (рис. 3) [29]. Он также состоял из энхансера (206 п.н.) и проксимального промотора, но содержал четыре важные модификации. Так, из 206 п.н. энхансера был удален регион между правым E-боксом и MEF-2-сайтом, представленный низкоконсервативной последовательностью. К промотору были добавлены высококонсервативные 50 п.н. из первого некодирующего экзона *MCK*. Последовательность, содержащую TSS, заменили на консенсусную последовательность Inr. Главная модификация состояла в том, что к описанной кассете был добавлен энхансер 188 п.н. гена тяжелой цепи

α -миозина мышцы (α -Mhc), обеспечивающий высокий уровень экспрессии в сердце [51]. Новый промотор МНСК7 протестировали в контексте ААВ-векторов. Этот промотор обеспечивал экспрессию трансгена, сопоставимую со значениями экспрессии, направляемой промоторами CMV и RSV, в скелетных и сердечных мышцах. При этом при внутривенном введении мышам ААВ6 наблюдалась низкая экспрессия трансгена в печени, легких и селезенке. Интересно, что МНСК7 был в 400 раз более активен в сердце и в 50 раз – в диафрагме по сравнению с промотором СК6.

Почти одновременно с промотором МНСК7 были созданы промоторы **dMCK** и **tMCK** (рис. 3) [52]. В этих конструкциях проксимальный промотор (358 п.н.) был сокращен до размеров базального промотора 87 п.н. (-80...+7), к которому добавлены две (**dMCK**) или три (**tMCK**) копии энхансера МСК (206 п.н.). В экспериментах по доставке трансгена с помощью векторов ААВ tMCK показал себя как наиболее эффективный промотор, опередив по уровню мышечно-специфической экспрессии промоторы CMV, dMCK и СК6. Промотор dMCK не приводил к экспрессии трансгена в сердце и диафрагме.

На этом поиск эффективных мышечно-специфических промоторов не закончился. В лаборатории, создавшей промоторы СК6 и МНСК7, были разработаны конструкции, названные **СК8** (рис. 3). Так, при внутримышечной ААВ8-опосредованной доставке гена гормона роста использовали промотор СК8, который представлял собой МНСК7 с двумя копиями энхансера МСК вместо энхансера тяжелой цепи α -миозина [53]. У мышей, получавших препарат, длина и масса тела были значительно больше по сравнению с мышами без лечения. В другой работе промотор СК8 был аналогичен вышеописанной конструкции, но содержал уже три копии энхансера МСК [31]. Отмечено, что использование трех копий энхансера вместо двух обеспечивает увеличение уровня экспрессии в 4 и 3 раза в скелетных миоцитах и сердце соответственно [31]. Конструкция **СК8e** (436 п.н.), содержащая ряд делеций в энхансере и проксимальном промоторе мышечной креатинкиназы (рис. 3), была активнее CMV-промотора в культуре дифференцированных миообластов человека [54]. Удаление низкоконсервативных областей из промотора не только способствовало уменьшению его длины, но также увеличивало его активность [31].

Благодаря высокой специфичности и активности в мышечных тканях, промоторы на основе гена МСК активно используются в векторах, проходящих клинические и доклинические испытания (таблица). МНСК7-промотор входит в состав векторов для генной терапии болезни Помпе, которые проходят доклинические исследования (ДИ) [8].

Уже ведутся клинические испытания (КИ) по лечению КПМД типа Е (NCT03652259), при которой пациентам доставляют функциональную копию гена β -саркогликана под МНСК7-промотором [55]. Этот промотор также применяют в КИ в составе конструкции для доставки гена дисферлина (NCT02710500) [56]. Проводятся КИ препарата на основе ААВrh74 для лечения миодистрофии Дюшенна с МНСК7-промотором (NCT03769116) [57]. Опосредованная ААВ9 доставка гена микродистрофина с СК8e-промотором (NCT03368742) [58] и tMCK-промотором использованы в других КИ (NCT04281485) [57]. Проходят также КИ доставки гена α -саркогликана под tMCK-промотором в терапии КПМД типа 2D (NCT01976091).

Промоторы на основе гена десмина

Десмин – мышечно-специфический белок семейства промежуточных филаментов цитоскелета [59]. Десмин кодируется геном *DES* и является одним из самых ранних маркеров миогенеза [59]. Этот ген уникален тем, что экспрессируется в сателлитных клетках и делящихся миообластах, при этом он в несколько раз более активен в дифференцированных мышечных клетках [60].

Функциональный анализ 5'-фланкирующей области гена десмина человека выявил в ней энхансер (-973...-693), который отвечает за мышечно-специфическую экспрессию [60]. 5'-Область энхансера содержит сайты связывания MEF-2, E-бокс и элемент Mt, она необходима для активации экспрессии в мышечных волокнах; 3'-половина энхансера ответственна за транскрипцию десмина в миообластах за счет связывания факторов SP1 и KROX-20 [60]. Регион -692...-228 является сайленсером, снижающим в 3–7 раз экспрессию в миообластах и мышечных волокнах, а область -228...+75 достаточна для запуска мышечно-специфической экспрессии на низком уровне [61, 62].

Полноразмерный ген дистрофина под промотором десмина человека (9546 п.н., регион -18662...+60) использовали в плазмидном векторе для внутриартериального введения мышам (рис. 4А) [63]. Промотор десмина обеспечивал на протяжении не менее 6 месяцев такой же уровень экспрессии дистрофина, как и промотор CMV.

Вариант промотора десмина человека (715 п.н.) с удаленным сайленсером использовали в сравнительном исследовании мышечно-специфических промоторов при опосредованной ААВ9 внутривенной доставке трансгена мышам (рис. 4Б) [64]. В этой работе десминовый промотор превзошел CMV-промотор и другие мышечно-специфические промоторы по уровню экспрессии трансгена в скелетных мыш-

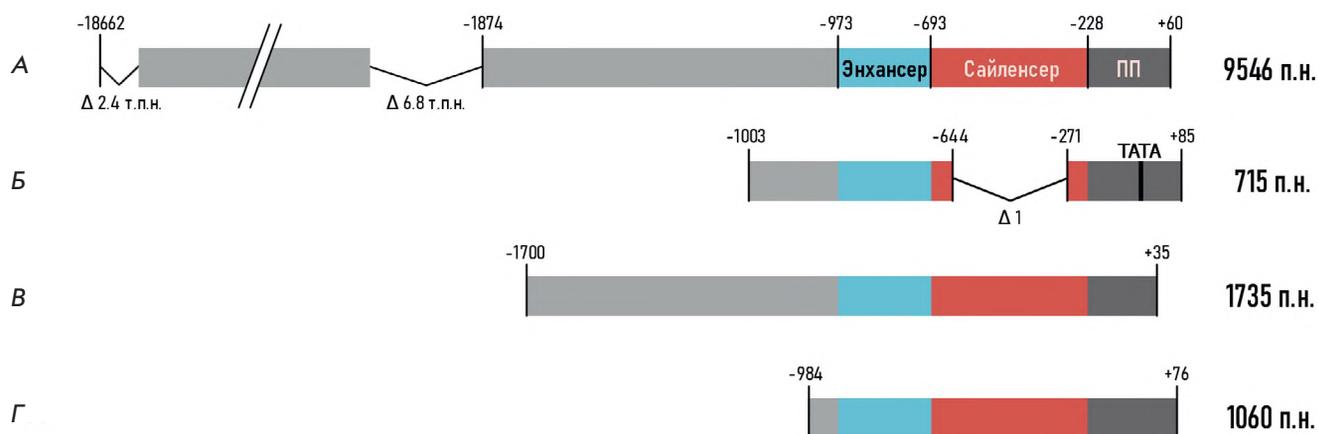


Рис. 4. Промоторы на основе гена *DES* человека. Промотор (А) содержит область контроля локуса гена десмина (18.7 т.п.н.) с внесенными делециями, энхансер, сайленсер и проксимальный промотор (ПП). Промотор (Б) с делецией сайленсера и ТАТА-боксом, внесенным в коровый промотор. Промоторы (В) и (Г) с делециями дистальных регионов

цах и диафрагме. По уровню экспрессии в сердце он уступал только CMV-промотору, однако обеспечивал высокий уровень экспрессии трансгена в мозге [64].

Другой вариант промотора десмина человека использовали для доставки трансгена в мышцы мышцей с помощью лентивирусных векторов [65]. Использован регион (-1700...+35), включающий промотор, сайленсер и энхансер (рис. 4В). По активности такой промотор соответствовал CMV-промотору *in vitro* и *in vivo* и даже превосходил в 6–8 раз по уровню экспрессии промотор человека *MCK* (-1061...+28).

Десминовые промоторы применяли в целом ряде работ (таблица), посвященных болезни Помпе [66]. В настоящий момент препарат rAAV9.DES.hGAA для лечения данного заболевания успешно проходит КИ (NCT02240407). Вариант промотора [64] использовали в ДИ при разработке генной терапии синдрома Барта [5]. Также промотор десмина применяли в ДИ в составе вектора для генной терапии КПМД 2А, характеризующейся нехваткой кальпаина 3 [9], и КПМД 2I с дефицитом фукутин-подобного белка [10]. Промотор гена десмина человека (-984...+76) (рис. 4Г) использовали в ДИ генной терапии миотубулярной миопатии, заболевания, обусловленного мутациями в гене *MTM1* [6]. В настоящий момент этот препарат успешно завершает КИ (NCT03199469).

Промоторы на основе других генов

Регуляторные области множества других генов, демонстрирующих мышечно-специфическую экспрессию, также были использованы для создания промоторов. Работы по поиску эффективного промотора велись параллельно во многих лабораториях, но только некоторые из них завершились успешно.

Так, были созданы лентивирусные конструкции, призванные обеспечить кардиоспецифическую экс-

прессию трансгена для заместительной терапии сердечного варианта болезни Фабри [67]. Среди них был промотор гена α -цепи миозина человека (α -MHC), представленный участком -1198...+1, промотор легкой цепи миозина (*MLC2v*, -250...+13) и сердечного тропонина Т (*cTnT*, -300...+1). Все три промотора превосходили повсеместно активный промотор *EF1 α* по уровню экспрессии трансгена в сердце мышцей. Промоторы *cTnT* и *MLC2v* экспрессировались не только в сердце, они были активны в печени и селезенке, тогда как под контролем α -MHC трансген экспрессировался строго в сердце [67]. Однако в другом исследовании промоторы на основе этих генов уступали десминовому промотору по уровню экспрессии в скелетных мышцах и сердце [64].

Для доставки микродистрофина в сердце мышцей с помощью AAV9 применяли также химерный промотор, который включал CMV-IE-энхансер, присоединенный к фрагменту (1.5 т.п.н.) промотора *MLC* крысы [68]. Такой промотор был в 4 раза более активным в сердце, чем CMV-промотор, где обеспечивал устойчивую экспрессию трансгена на протяжении 10 месяцев, но был неактивен в скелетных мышцах и печени [69].

На основе гена медленного тропонина I человека (*TNNI1*) создан промотор Δ USEx3, который включал три копии энхансера этого гена (-1036...-873) и минимальный промотор гена *TNNI1* с частью первого экзона (-95...+56) [70]. Промотор Δ USEx3 слабо активен в немускульных клетках и тканях в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Стоит отметить, что промотор Δ USEx3 при доставке с помощью аденовирусов обеспечивал сопоставимый уровень экспрессии трансгена с синтетическим промотором SPc Δ 5-12 [71], однако при лентивирусной доставке Δ USEx3 был в 5 раз менее активен, чем промотор SPc Δ 5-

12, что, вероятно, связано с эффектами интеграции конструкции в геном.

Ген *unc45b*, кодирующий мышечно-специфический шаперон миозина у рыб, также использовали для создания мышечно-специфического промотора [72]. Так, фрагмент промотора 195 п.н. (-505...-310) был способен запускать экспрессию в скелетных и сердечных мышцах рыб, а также обеспечивал экспрессию репортерного белка в мышцах мышей при доставке плазмид с помощью электропорации.

Стоит отметить, что описанные выше промоторы обеспечивали мышечно-специфическую экспрессию, но были менее активными, чем промоторы на основе генов актина, мышечной креатинкиназы или десмина.

Синтетические промоторы

В настоящий момент наиболее перспективным и многообещающим подходом представляется создание гибридных или синтетических промоторов. Данная стратегия позволяет конструировать промоторы необходимого размера, задавать время, место и уровень экспрессии целевого гена.

В основе создания синтетических промоторов лежат биоинформатические методы выявления регуляторных областей генома, TFBS, предсказания промоторных областей [73–75]. Сайты связывания миогенных ТФ, как правило, меньше 10 п.н. [73], что позволяет создавать библиотеки конструкций, представленные комбинациями из мышечно-специфических TFBS. При этом подходе проводится трудоемкий анализ множества новых синтетических конструкций. Экспериментальным путем необходимо выяснить количество копий нужного мотива, расстояния между TFBS для успешного связывания фактора транскрипции, мотивы, которые работают синергично, и TFBS, вносящие наибольший вклад в усиление экспрессии. Чтобы обойти подобные трудности, можно вернуться к анализу природных промоторов, извлекая уже готовые работающие комбинации мышечно-специфических TFBS, и конструировать промоторы из подобных кластеров. *In silico* анализ может существенно упростить выявление регуляторных областей.

В одной из первых работ по созданию синтетического мышечно-специфического промотора проанализировали организацию сильных мышечных промоторов и вычленили в их структуре распространенные сайты связывания миогенных факторов транскрипции: SRE, MEF2, MEF1 и TEF1, которые случайно лигировали друг с другом в прямой и обратной ориентации. Полученные фрагменты поместили перед минимальным промотором гена α -скелетного актина курицы (рис. 5) с целью создания библиотеки из более чем 1000 вариантов промоторов. Активность по-

лученных конструкций проанализировали на первичных миобластах и отобрали промотор **SPc5-12** (рис. 5), который был в 6 раз более активным в мышечных волокнах по сравнению с CMV-промотором. При этом промотор был неактивен в недифференцированных миобластах, а также в различных немускульных клеточных линиях, что подтвердилось в экспериментах *in vivo*.

Промотор SPc5-12 использовали для экспрессии трансгена в экспериментах на животных моделях миодистрофии Дюшенна [76], болезни Помпе [77], дисферлинопатии [78], а также для обеспечения экспрессии гормона роста [79]. SPc5-12-промотор применяли также в ДИ в составе генотерапевтического препарата для коррекции окулофарингеальной мышечной дистрофии [11].

Сходным подходом воспользовались при создании синтетического промотора [80] с использованием 19 элементов, среди которых было восемь мышечно-специфических TFBS, шесть вирусных элементов из CMV и SV40-промоторов, а также пять консервативных *cis*-действующих элементов промоторов эукариот (ТАТА-бокс и др.). Эти мотивы были произвольным образом лигированы друг с другом для создания библиотеки из 1200 первичных клонов, которые тестировали *in vitro* и *in vivo*. Наилучшие результаты показал промотор **SP-301** (рис. 5), который был активнее CMV-промотора в 6.6 раза спустя 2 дня после введения конструкции мышам и сохранял активность на протяжении минимум месяца. Многие промоторы, более активные, чем CMV *in vitro*, имели меньшую активность по сравнению с этим промотором *in vivo*. Промотор SP-301 подтвердил свою тканевую специфичность в трансгенных мышцах. Проведенное исследование подтвердило успешность стратегии создания синтетических промоторов из комбинации TFBS, а также потенциальную важность использования не только мышечно-специфических TFBS, но и вирусных мотивов, способных значительно увеличить показатели экспрессии.

Другой успешный подход, который мы уже частично рассмотрели на примере промотора МНСК7 [29], предполагает создание гибридных промоторов. В работе, использующей эту стратегию, был проведен *in silico* анализ различных мышечно-специфических генов [30]. Выявлены четыре кластера, состоящие из комбинации сайтов связывания миогенных ТФ. Первым кластером был ранее рассмотренный энхансер гена десмина человека (-970...-826) [81], а остальные три были регионами энхансера (-1262... -1060), проксимального промотора (-358...+7) и первого интрона (+901...+995) гена *Skf* мыши. **МН-промотор**, включающий в себя все четыре элемента, показал наилучшие результаты в культурах клеток, опередив

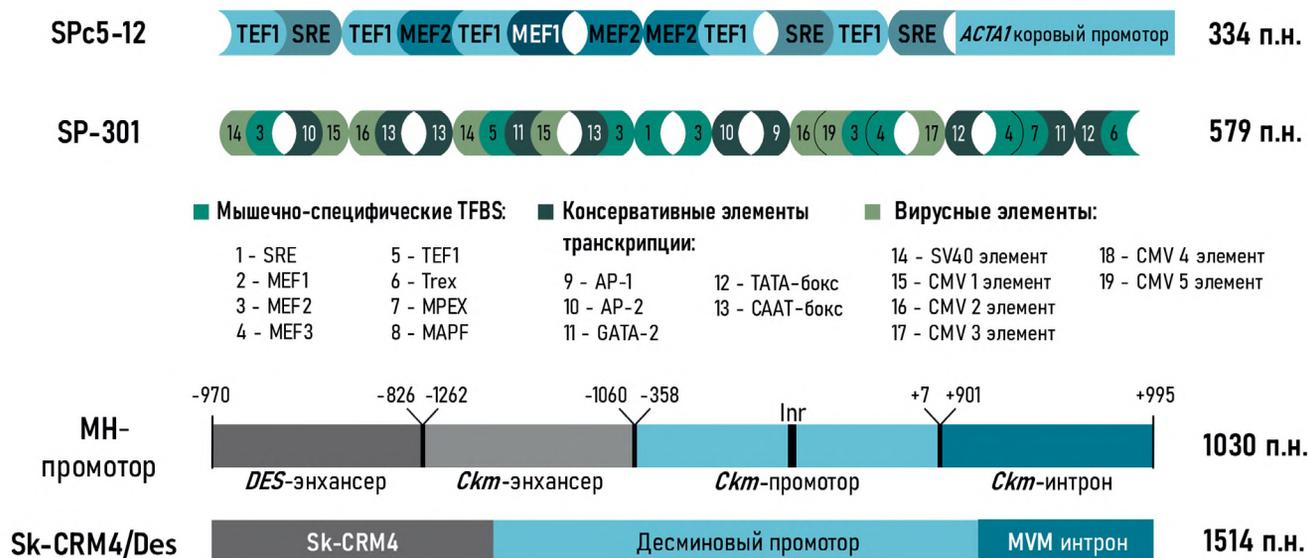


Рис. 5. Синтетические промоторы. Промотор SPc5-12 состоит из комбинации четырех мышечно-специфических TFBS: TEF1, SRE, MEF1 и MEF2, а также корового промотора – фрагмента промотора скелетного α -актина курицы. SP-301-промотор представляет комбинацию мышечно-специфических TFBS, вирусных элементов и консервативных *cis*-действующих элементов, сшитых в прямой и обратной ориентации. МН-промотор состоит из энхансера гена десмина человека, а также энхансера, корового промотора и первого интрона гена *Ckm* мыши. Sk-CRM4/Des представляет собой регуляторный модуль Sk-CRM4, сшитый с десминовым промотором, а также с интроном MVM

по уровню экспрессии в мышечных культурах клеток десминовый и CMV-промоторы, а также остальные гибридные промоторы. Интересно, что наибольший вклад в уровень экспрессии вносил интрон, в то время как удаление одного или двух энхансеров или даже корового промотора не приводило к значительному изменению уровня экспрессии. Для проверки активности гибридного промотора *in vivo* мышам внутривенно вводили AAV9, несущий репортерный ген под данным промотором. МН-промотор оказался более активным в сердце и скелетных мышцах, чем промоторы гена десмина и CMV, и при этом не приводил к экспрессии трансгена в печени [30].

Стратегию использования мышечно-специфических *cis*-регуляторных модулей (Sk-CRM) использовали в следующей статье [82]. В данной работе разместили TFBS на промоторах генов человека, активно экспрессирующихся в мышцах, и проанализировали, склонны ли они к образованию кластеров. Были сделаны множественные выравнивания таких кластеров разных видов животных с целью поиска консервативных фрагментов. Подразумевалось, что более консервативная комбинация регуляторных элементов наиболее эффективна для обеспечения высокой мышечно-специфической экспрессии. Было также проверено, относятся ли выбранные кластеры к открытым участкам хроматина, и по итогам всех манипуляций отобрано семь вариантов. По результатам анализа биолюминесценции выбран модуль

Sk-CRM4 (рис. 5), который в 200–400 раз усиливал работу промотора десмина в различных скелетных мышцах, диафрагме и сердце через 6 недель после системной доставки с помощью AAV9. При этом Sk-CRM4 был неактивен в немускульных органах. Позднее показали, что Sk-CRM4/Des в 25–173 раза эффективнее CMV-промотора в различных мышцах, а также эффективнее Sk-CRM4/SPc5-12 и SPc5-12. По итогам работы был создан чрезвычайно сильный промотор Sk-CRM4/Des, единственным недостатком которого была большая длина – около 1500 п.н.

Создание синтетических промоторов – очень перспективное направление, успешность которого определяется качеством биоинформатической работы и эффективным скринингом предложенных вариантов. Пополнение баз данных регуляторных элементов, обнаружение новых ТФ, совершенствование программ выявления промоторов безусловно будут способствовать развитию этого направления [73–75].

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ЭКСПРЕССИЮ

Экспрессия генов интереса в нужном месте и в нужное время при разработке генотерапевтических препаратов рассматривается комплексно и зависит не только от активности промотора. На посттранскрипционном уровне многие факторы также оказывают влияние на экспрессию доставляемого гена.

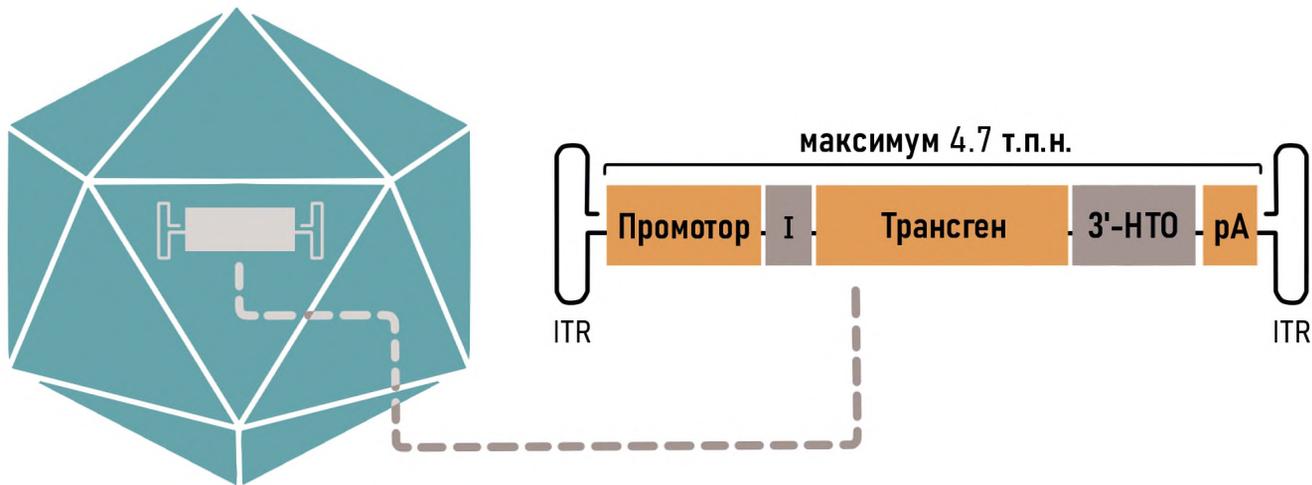


Рис. 6. Компоненты типичной кассеты ААВ-вектора. Оранжевые блоки (промотор, трансген и сигнал полиаденилирования (pA)) являются обязательными компонентами кассеты. Для повышения эффективности экспрессии могут быть включены необязательные *cis*-регуляторные элементы, такие, как интрон (I), WPRE и сайты связывания микроРНК (3'-НТО). Кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR)

Наличие интрона в векторе, который обычно помещают между промотором и кодирующей последовательностью, способен улучшить экспрессию целевого гена (рис. 6). Интрон повышает стабильность РНК в ядре благодаря включению в сплайсому [74], а также способствует эффективному экспорту сплайсированной мРНК из ядра в цитоплазму [83]. Интроны также могут содержать регуляторные последовательности, влияющие на тканевую специфичность экспрессии и ее уровень. Так, именно наличие интрона из гена *Skt* внесло наибольший вклад в уровень экспрессии трансгена, направляемой сконструированным химерным промотором [30]. При ААВ-опосредованной доставке трансгена фактора свертывания крови IX MVM-интрон обеспечил повышение экспрессии более чем в 80 раз по сравнению с конструкцией без интрона [84].

Помимо промоторов к кассете в 3'-НТО для повышения экспрессии могут быть добавлены другие *cis*-регуляторные элементы (рис. 6). Так, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) длиной 600 п.н. в несколько раз улучшал экспрессию трансгена, доставленного с использованием ААВ, в печени, мозге и мышцах мышей и крыс [85]. WPRE способствует экспорту мРНК из ядра, а также предотвращает сайленсинг на посттранскрипционном уровне [86].

К обеспечению тканевой специфичности можно подойти и с другой стороны, не только стимулируя экспрессию в целевых тканях, но и подавляя ее в нежелательных органах с помощью механизмов РНК-интерференции [74]. С этой целью в 3'-НТО-кассеты добавляют сайты связывания микроРНК, присутствующих строго в нецелевых органах (рис. 6) [87].

Если мРНК трансгена оказывается в нежелательном органе, то микроРНК связывается с комплементарными сайтами в транскрипте и запускает его деградацию [87].

Большую роль в доставке генетических конструкций в определенные органы и ткани играет также правильный выбор вирусного вектора. Помимо использования природных серотипов ААВ, для улучшения целевой доставки модифицируют капсиды, создавая новые геноинженерные векторы [88]. Ведется поиск новых натуральных капсидов с улучшенным тропизмом к сердцу и скелетным мышцам [89]. В зависимости от способа введения препарата (внутривенный, внутримышечный и др.) паттерны экспрессии также будут отличаться [90].

Продуманная комбинация вышеперечисленных элементов в кассете, правильный выбор вектора и оптимальный способ введения генотерапевтического препарата могут существенно повысить экспрессию гена интереса, сохраняя при этом тканеспецифичность экспрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История поиска и создания мышечно-специфических промоторов для генной терапии насчитывает уже более 30 лет, и до сих пор работы в этом направлении не окончены. Так, размеры первых мышечно-специфических промоторов, представляющих собой фрагменты генов актина, десмина или мышечной креатинкиназы, превышали 1 т.п.н. Созданные позднее синтетические варианты, содержащие наиболее представленные TFBS из промоторов этих генов, были в несколько раз короче, но не уступали естественным аналогам по эффективности экспрессии [30, 71].

Факторы транскрипции позвоночных и их сайты связывания довольно консервативны, что показано в многочисленных работах [42, 72]. Благодаря такому консервативному составу промоторов в доклинических исследованиях для демонстрации эффективности генотерапевтических препаратов можно использовать различных модельных животных. Однако следует учесть, что активность промотора *in vitro* не всегда будет совпадать с его активностью *in vivo* [80].

Принимая во внимание гетерогенность генетических мышечных заболеваний, невозможно говорить об одном универсальном промоторе, который

можно использовать для разработки всех терапевтических векторов. Это связано, в первую очередь, с особенностями патогенеза, разными функциями белков, дефицит или дисфункция которых вызывают то или иное заболевание (*таблица*). При разных заболеваниях в большей степени поражаются разные группы мышц и типы мышечных волокон [14]. Накопленный опыт создания синтетических мышечных промоторов дает надежду на то, что исследователям удастся создать идеальные конструкции, чтобы сымитировать уникальный профиль экспрессии мышечно-специфических белков и полностью восстановить утраченные функции. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Theadom A., Rodrigues M., Poke G., O'Grady G., Love D., Hammond-Tooke G., Parmar P., Baker R., Feigin V., Jones K., et al. // *Neuroepidemiology*. 2019. V. 52. № 3–4. P. 128–135.
- Shieh P.B. // *Neurol. Clin.* 2013. V. 31. № 4. P. 1009–1029.
- Anguela X.M., High K.A. // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 273–288.
- Manso A., Hashem S., Nelson B., Gault E., Soto-Hermida A., Villarruel E., Brambatti M., Bogomolovas J., Bushway P., Chen C., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. P. eaax1744.
- Suzuki-Hatano S., Saha M., Soustek M.S., Kang P.B., Byrne B.J., Cade W.T., Pacak C.A. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 13. P. 167–179.
- Childers M.K., Joubert R., Poulard K., Moal C., Grange R.W., Doering J.A., Lawlor M.W., Rider B.E., Jamet T., Danièle N., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 220. P. 220ra10.
- Qiao C., Dai Y., Nikolova V.D., Jin Q., Li J., Xiao B., Li J., Moy S.S., Xiao X. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2018. V. 9. P. 47–56.
- Han S., Li S., Bird A., Koeberl D. // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. № 11. P. 743–750.
- Lostal W., Roudaut C., Faivre M., Karine C., Suel L., Bourg N., Best H., Smith J., Gohlke J., Corre G., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. P. eaat6072.
- Gicquel E., Maizonnier N., Foltz S.J., Martin W.J., Bourg N., Svinartchouk F., Charton K., Beedle A.M., Richard I. // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. № 10. P. 1952–1965.
- Malerba A., Klein P., Bachtarzi H., Jarmin S.A., Cordova G., Ferry A., Strings V., Espinoza M.P., Mamchaoui K., Blumen S.C., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14848.
- Marshall D.J., Leiden J.M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998. V. 8. № 3. P. 360–365.
- Janssen I., Heymsfield S.B., Wang Z.M., Ross R. // *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985. 2000. V. 89. № 1. P. 81–88.
- Gaina G., Budisteanu M., Manole E., Ionica E. // *Muscular Dystrophies*. 2019. doi: 10.5772/intechopen.85339
- Shirley J.L., de Jong Y.P., Terhorst C., Herzog R.W. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2020. V. 28. № 3. P. 709–722.
- Duan B., Cheng L., Gao Y., Yin F.X., Su G.H., Shen Q.Y., Liu K., Hu X., Liu X., Li G.P. // *Theriogenology*. 2012. V. 78. № 4. P. 793–802.
- Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. // *Молекуляр. биол.* 2015. Т. 49. № 2. С. 212.
- Haberle V., Stark A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 10. P. 621–637.
- Vo Ngoc L., Wang Y.-L., Kassavetis G.A., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 13. P. 1289–1301.
- Vo Ngoc L., Cassidy C.J., Huang C.Y., Duttke S.H.C., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 1. P. 6–11.
- Sainsbury S., Bernecky C., Cramer P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 3. P. 129–143.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. № 22. P. 3020–3031.
- Lim C.Y., Santos B., Boulay T., Dong E., Ohler U., Kadonaga J.T. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 13. P. 1606–1617.
- Deng W., Roberts S.G.E. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 20. P. 2418–2423.
- Maston G.A., Evans S.K., Green M.R. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006. V. 7. P. 29–59.
- Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. // *Cell*. 2018. V. 172. № 4. P. 650–665.
- Long H.K., Prescott S.L., Wysocka J. // *Cell*. 2016. V. 167. № 5. P. 1170–1187.
- Riethoven J.-J.M. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. 2010. V. 674. P. 33–42.
- Salva M.Z., Himeda C.L., Tai P.W., Nishiuchi E., Gregorevic P., Allen J.M., Finn E.E., Nguyen Q.G., Blankinship M.J., Meuse L., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2007. V. 15. № 2. P. 320–329.
- Piekarczyk K., Bertrand A.T., Azibani F., Beuvin M., Julien L., Machowska M., Bonne G., Rzepecki R. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 15. P. 157–169.
- Himeda C.L., Chen X., Hauschka S.D. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*. 2011. V. 709. P. 3–19.
- Somlyo A.V., Siegelman M.J. // *Muscle*. Elsevier. 2012. V. 2. P. 1117–1132. doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00083-1
- Gunning P., Ponte P., Blau H., Kedes L. // *Mol. Cell. Biol.* 1983. V. 3. № 11. P. 1985–1995.
- Muscat G.E., Kedes L. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. № 11. P. 4089–4099.
- Brennan K.J., Hardeman E.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 1. P. 719–725.
- Crawford G.E., Faulkner J.A., Crosbie R.H., Campbell K.P., Froehner S.C., Chamberlain J.S. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. № 6. P. 1399–1410.
- Glover L.E., Newton K., Krishnan G., Bronson R., Boyle A., Krivickas L.S., Brown R.H. // *Ann. Neurol.* 2010. V. 67. № 3. P. 384–393.
- Miniou P., Tiziano D., Frugier T., Roblot N., Le Meur M., Melki J. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 19. P. e27.
- Kimura E., Li S., Gregorevic P., Fall B.M., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 1. P. 206–213.
- Strimpakos G., Corbi N., Pisani C., Di Certo M.G., Onori A.,

- Luvisetto S., Severini C., Gabanella F., Monaco L., Mattei E., et al. // *J. Cell. Physiol.* 2014. V. 229. № 9. P. 1283–1291.
41. Hagstrom J.N., Couto L.B., Scallan C., Burton M., McClelland M.L., Fields P.A., Arruda V.R., Herzog R.W., High K.A. // *Blood.* 2000. V. 95. № 8. P. 2536–2542.
42. Petropoulos C.J., Rosenberg M.P., Jenkins N.A., Copeland N.G., Hughes S.H. // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. № 9. P. 3785–3792.
43. Asante E.A., Boswell J.M., Burt D.W., Bulfield G. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. № 1. P. 59–66.
44. Hu Q., Tong H., Zhao D., Cao Y., Zhang W., Chang S., Yang Y., Yan Y. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2015. V. 20. № 1. P. 160–176.
45. Welle S., Bhatt K., Thornton C.A. // *Genome Res.* 1999. V. 9. № 5. P. 506–513.
46. Jaynes J.B., Chamberlain J.S., Buskin J.N., Johnson J.E., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1986. V. 6. № 8. P. 2855–2864.
47. Shield M.A., Haugen H.S., Clegg C.H., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 9. P. 5058–5068.
48. Amacher S.L., Buskin J.N., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 5. P. 2753–2764.
49. Donoviel D.B., Shield M.A., Buskin J.N., Haugen H.S., Clegg C.H., Hauschka S.D. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. № 4. P. 1649–1658.
50. Hauser M.A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., Williams-Gregory D.A., Buskin J.N., Apone S., Kirk C.J., Hardy S., Hauschka S.D., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2000. V. 2. № 1. P. 16–25.
51. Molkentin J.D., Jobe S.M., Markham B.E. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996. V. 28. № 6. P. 1211–1225.
52. Wang B., Li J., Fu F.H., Chen C., Zhu X., Zhou L., Jiang X., Xiao X. // *Gene Ther.* 2008. V. 15. № 22. P. 1489–1499.
53. Martari M., Sagazio A., Mohamadi A., Nguyen Q., Hauschka S.D., Kim E., Salvatori R. // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 7. P. 759–766.
54. Gonçalves M.A., Janssen J.M., Nguyen Q.G., Athanasopoulos T., Hauschka S.D., Dickson G., de Vries A.A. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 7. P. 1331–1341.
55. Pozsgai E.R., Griffin D.A., Heller K.N., Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2017. V. 25. № 4. P. 855–869.
56. Potter R.A., Griffin D.A., Sondergaard P.C., Johnson R.W., Pozsgai E.R., Heller K.N., Peterson E.L., Lehtimäki K.K., Windish H.P., Mittal P.J., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 7. P. 749–762.
57. Duan D. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2018. V. 26. № 10. P. 2337–2356.
58. Hakim C.H., Wasala N.B., Pan X., Kodippili K., Yue Y., Zhang K., Yao G., Haffner B., Duan S.X., Ramos J., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017. V. 6. P. 216–230.
59. Buckingham M. // *Trends Genet.* 1992. V. 8. № 4. P. 144–148.
60. Raguz S., Hobbs C., Yagüe E., Ioannou P.A., Walsh F.S., Antoniou M. // *Dev. Biol.* 1998. V. 201. № 1. P. 26–42.
61. Li Z.L., Paulin D. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 10. P. 6562–6570.
62. Li Z., Colucci E., Babinet C., Paulin D. // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 1993. V. 3. № 5–6. P. 423–427.
63. Zhang G., Ludtke J.J., Thioudellet C., Kleinpeter P., Antoniou M., Herweijer H., Braun S., Wolff J.A. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 8. P. 770–782.
64. Pacak C.A., Sakai Y., Thattaliyath B.D., Mah C.S., Byrne B.J. // *Genet. Vaccines Ther.* 2008. V. 6. P. 13.
65. Talbot G.E., Waddington S.N., Bales O., Tchen R.C., Antoniou M.N. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 3. P. 601–608.
66. Salabarria S.M., Nair J., Clement N., Smith B.K., Raben N., Fuller D.D., Byrne B.J., Corti M. // *J. Neuromuscul. Dis.* 2020. V. 7. № 1. P. 15–31.
67. Lee C.-J., Fan X., Guo X., Medin J.A. // *J. Cardiol.* 2011. V. 57. № 1. P. 115–122.
68. Müller O.J., Leuchs B., Pleger S.T., Grimm D., Franz W.-M., Katus H.A., Kleinschmidt J.A. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 70. № 1. P. 70–78.
69. Schinkel S., Bauer R., Bekeredjian R., Stucka R., Rutschow D., Lochmüller H., Kleinschmidt J.A., Katus H.A., Müller O.J. // *Hum. Gene Ther.* 2012. V. 23. № 6. P. 566–575.
70. Robert M.-A., Lin Y., Bendjelloul M., Zeng Y., Dessolin S., Broussau S., Larochelle N., Nalbantoglu J., Massie B., Gilbert R. // *J. Gene Med.* 2012. V. 14. P. 746–760.
71. Li X., Eastman E.M., Schwartz R.J., Draghia-Akli R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 3. P. 241–245.
72. Rudeck S., Etard C., Khan M.M., Rottbauer W., Rudolf R., Strähle U., Just S. // *Genesis.* 2016. V. 54. № 8. P. 431–438. doi: 10.1002/dvg.22953
73. Aysha J., Noman M., Wang F., Liu W., Zhou Y., Li H., Li X. // *Mol. Biotechnol.* 2018. V. 60. № 8. P. 608–620.
74. Domenger C., Grimm D. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № R1. P. R3–R14.
75. Boeva V. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 24.
76. Le Guiner C., Servais L., Montus M., Larcher T., Fraysse B., Moullec S., Allais M., François V., Dutilleul M., Malerba A., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 16105.
77. Colella P., Sellier P., Costa Verdera H., Puzzo F., van Wittenberghe L., Guerchet N., Daniele N., Gjata B., Marmier S., Charles S., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 12. P. 85–101.
78. Escobar H., Schöwel V., Spuler S., Marg A., Izsvák Z. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2016. V. 5. P. e277.
79. Khan A.S., Draghia-Akli R., Shypailo R.J., Ellis K.I., Mersmann H., Fiorotto M.L. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 327–333.
80. Liu Y., He Y., Wang Y., Liu M., Jiang M., Gao R., Wang G. // *Plasmid.* 2019. V. 106. P. 102441.
81. Li H., Capetanaki Y. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 15. P. 3580–3589.
82. Sarcar S., Tulalamba W., Rincon M.Y., Tipanee J., Pham H.Q., Evens H., Boon D., Samara-Kuko E., Keyaerts M., Loperfido M., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 492–510.
83. Crane M.M., Sands B., Battaglia C., Johnson B., Yun S., Kaeberlein M., Brent R., Mendenhall A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 9192. doi: 10.1038/s41598-019-45517-0
84. Wu Z., Sun J., Zhang T., Yin C., Yin F., van Dyke T., Samulski R.J., Monahan P.E. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2008. V. 16. № 2. P. 280–289.
85. Wang L., Wang Z., Zhang F., Zhu R., Bi J., Wu J., Zhang H., Wu H., Kong W., Yu B., et al. // *Int. J. Med. Sci.* 2016. V. 13. № 4. P. 286–291.
86. Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. // *Discov. Med.* 2015. V. 19. № 102. P. 49–57.
87. Geisler A., Fechner H. // *World J. Exp. Med.* 2016. V. 6. № 2. P. 37–54.
88. Büning H., Srivastava A. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 12. P. 248–265.
89. Bello A., Chand A., Aviles J., Soule G., Auricchio A., Kobinger G.P. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–11.
90. Fumoto S., Kawakami S., Hashida M., Nishida K. // *Nov. Gene Ther. Approaches.* 2013. V. 1. P. 5–12.

УДК 577.152.2

Разнообразие и функции топоизомераз типа II

Д. А. Сутормин^{1,2*}, А. Х. Галивонджян^{3,4}, А. В. Полховский^{1,2}, С. О. Камалян^{1,2},
К. В. Северинов^{2,5,6}, С. А. Дубилей^{1,2}

¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

²Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182 Россия

⁵Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ИБГ РАН, Москва, 119334 Россия

⁶Институт микробиологии Ваксмана, Пискатэвей, Нью-Джерси 08854, США

*E-mail: sutormin94@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2020

Принята к печати 09.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11058

РЕФЕРАТ Двойная спираль ДНК является элегантным способом хранения информации с точки зрения механизма копирования и стабильности молекулы. Однако любые процессы матричного синтеза, такие, как транскрипция и репликация, связаны с разъединением цепей ДНК, а потому вызывают побочный топологический эффект – суперспирализацию молекулы. Как следствие, при репликации дочерние молекулы ДНК могут оказаться топологически сцепленными (образуют так называемые катенаны), а также способны образовывать узлы. Разрешением топологических проблем, а именно, релаксацией супервитков ДНК, разъединением катенанов и узлов занимаются специальные ферменты – топоизомеразы. Мы рассмотрим представителей топоизомераз типа II – механизм катализа, эволюцию, разнообразие и роль этих ферментов у организмов всех доменов жизни, в том числе вирусов и мобильных генетических элементов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА топоизомеразы, суперспирализация, декатенация, транскрипция, репликация, сегрегация ДНК, пространственная организация хромосом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ LUSA – последний всеобщий предок; CTD – С-концевой домен; ТАД – топологически ассоциированный домен.

ТОПОЛОГИЯ ДНК

Для описания топологического состояния ДНК и уровня ее суперспирализации используют понятие «порядок зацепления» (от англ. linking number – Lk) [1]. Если представить одну из цепей ковалентно замкнутой кольцевой молекулы ДНК в качестве границы воображаемой поверхности, то порядок зацепления цепей ДНК будет равен числу пересечений этой поверхности второй цепью ДНК с учетом знака этого пересечения (рис. 1А). Lk не зависит от деформаций молекулы и может быть изменен только путем разрыва, переноса и религирирования цепей ДНК (рис. 1А) [2]. Характеристикой релаксированной молекулы ДНК является теоретический порядок зацепления (Lk^0), равный отношению длины молекулы в нуклеотидах (N) к периоду ДНК ($h = 10.5$ нт/виток для канонической В-формы ДНК) (1). Lk молекул ДНК, выделенных из живых организмов, отличается от Lk^0 – он может как превышать Lk^0 ($\Delta Lk > 0$, тогда говорят о положительной суперспирализации молекулы), так и быть меньше Lk^0 ($\Delta Lk < 0$, отрицательно суперспирализованные молекулы) (2).

Lk складывается из двух геометрических характеристик двойной спирали, называемых твист (от англ. twist – Tw) и райзинг (от англ. writhe – Wr) (3). Твист определяется как количество витков, которые совершают цепи ДНК вокруг друг друга вдоль оси двойной спирали, тогда как райзинг является мерой спирализации оси молекулы ДНК [3]. При изменении Lk относительно Lk^0 суперспирализация распределяется между изменениями твиста и райзинга (4), которые могут переходить друг в друга. Например, согласно данным электронной микроскопии плазмид, 75% суперспирализации ДНК приходится на райзинг и 25% – на изменение твиста [3]. В природе суперспирализация ДНК в форме райзинга стабильно существует в двух формах – плектономы (образование двойной спирали более высокого порядка) и соленоиды (одинарной спирали более высокого порядка, характерной, например, для ДНК, обернутой вокруг белка) (рис. 1Б) [3]. Более подробное и всеобъемлющее обсуждение топологии ДНК можно найти, например, в книге “DNA Topology”, Bates & Maxwell, 2005 [3].

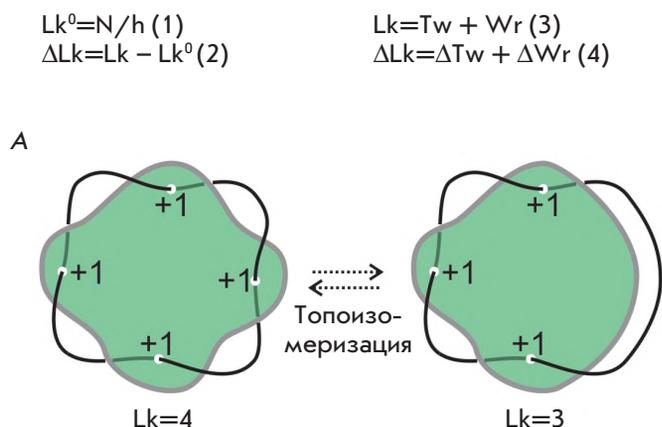


Рис. 1. Топология ДНК. Порядок зацепления кольцевой молекулы ДНК и его изменение в результате расщепления и переноса цепи (А) и пространственные структуры, возникающие в результате суперспирализации ДНК – плектонома и соленоид (Б)

СТРОЕНИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ И КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ТОПОИЗОМЕРАЗ ТИПА II

Регуляцией уровня суперспирализации ДНК и разрешением узлов и катенанов занимаются специальные ферменты – топоизомеразы [4, 5]. На основе строения, гомологии и каталитического механизма топоизомеразы принято делить на два типа – I и II [4]. Топоизомеразы I вносят одноцепочечный разрыв в ДНК (ник) и либо за счет вращения дуплекса ДНК вокруг второй целой цепи (класс IB, меняют Lk молекулы на произвольное целое число за один акт катализа), либо переносом целой цепи сквозь ник (класс IA, меняют Lk на ± 1) манипулируют суперспирализацией молекулы. Топоизомеразы II разрезают обе цепи в фрагменте ДНК, называемом G-сегментом, и переносят через этот разрыв второй дуплекс – T-сегмент ДНК, гидролизуя при этом две молекулы АТФ (рис. 3) [6–8]. Эта операция топологически эквивалентна изменению Lk на ± 2 [9]. Ниже мы проанализируем разнообразие, механизмы и физиологическую роль ферментов, относящихся к типу II.

Топоизомеразы II обнаружены у представителей всех доменов жизни и закодированы в подавляющем большинстве секвенированных геномов клеточных организмов за исключением нескольких экстремально редуцированных [10, 11]. Во всех изученных случаях показана необходимость топоизомеразы II для транскрипции, репликации и сегрегации хромосом при делении клетки.

На основе строения и особенностей каталитического цикла топоизомеразы II подразделяют на два класса – IIA и IIB (рис. 2, 3) [4]. Топоизомеразы могут быть гетеротетрамерами, состоящими из двух В- и двух А-субъединиц, либо гомодимерами, в которых субъединицы В и А объединились в единый полипептид [10]. Субъединицы топоизомераз имеют интерфейсы димеризации, так называемые ворота. Консервативный АТФ-гидролизующий GНKL (от англ. Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL) домен [12] образует N-ворота, домены Toprim и WHD

(от англ. Topoisomerase/Primase и Winged-helix domain) формируют ДНК-ворота [13]. В этой области фермента связывается G-сегмент ДНК, который расщепляется тирозинами активного центра WHD-доменов [14]. Третий интерфейс димеризации (С-ворота), образованный доменом coiled-coil (CC), есть только у IIA ферментов (рис. 2) [15]. На С-конце А-субъединиц или всего полипептида в случае слитых форм расположен С-концевой домен (СТD, от англ. C-terminal domain), который определяет специфичность топоизомераз к структурам ДНК (супервиткам или перекрестам молекул), взаимодействует с другими белками, и у эукариот является мишенью для посттрансляционных модификаций, за счет которых регулируется активность фермента [16–18].

Считается, что на первом этапе каталитического цикла топоизомеразы IIA связывает ДНК в области ДНК-ворот (G-сегмент ДНК) [19]. Связывание вызывает изгибание ДНК, что, вероятно, является механизмом топологического сканирования ДНК ферментом – топоизомеразой преимущественно свяжется с суперспирализованной областью молекулы, которая уже изогнута или может быть легко изогнута за счет энергии суперспирализации [20–22]. Затем происходит улавливание Т-сегмента ДНК между GНKL-доменами и ДНК-воротами. Связывание двух молекул АТФ с АТФ-азными центрами приводит к димеризации GНKL-доменов, закрыванию N-ворот и надежному захвату Т-сегмента [23]. Гидролиз первой молекулы АТФ до АДФ запускает механизм расщепления G-сегмента ДНК тирозинами нуклеазных центров WHD-доменов и открывает ДНК-ворота, в результате чего Т-сегмент направленно проходит через разрыв и оказывается в полости белка у С-ворот [7, 13, 24, 25]. Для фиксации двухцепочечного разрыва гидроксильные группы тирозинов остаются связанными с 5'-концами ДНК фосфодиэфирными связями. Открытие С-ворот, которое выпускает Т-сегмент из ферментативного комплекса, происходит после закрытия ДНК-ворот

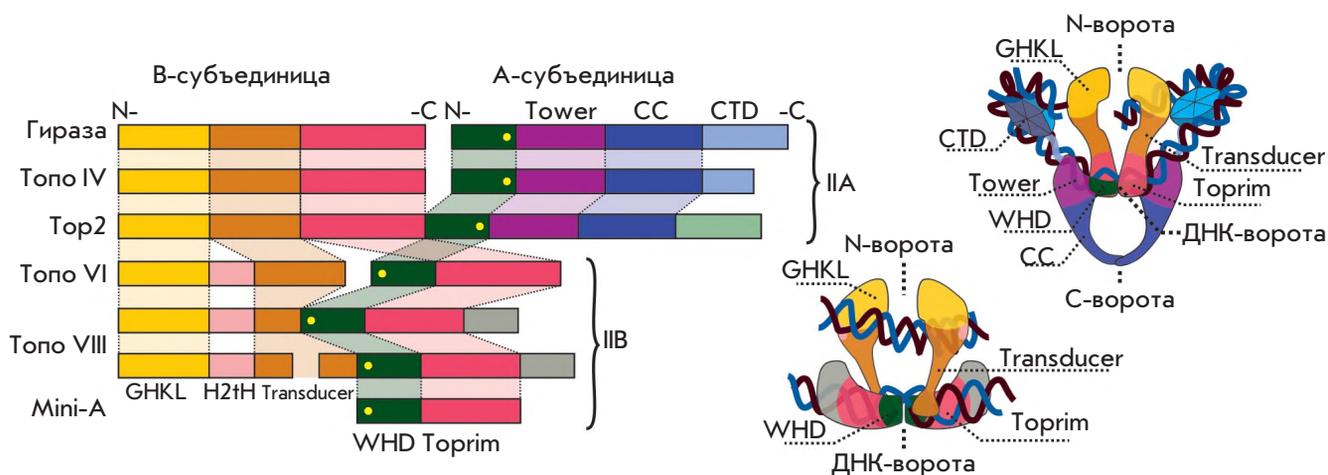


Рис. 2. Строение топоизомераз типа II. Слева – варианты доменной архитектуры ферментов. Гомологичные домены показаны одним цветом. Тирозин каталитического центра WHD-домена, необходимый для расщепления ДНК, отмечен желтым кругом. Справа – положение доменов на схематичной пространственной структуре топоизомераз IIA (на примере ДНК-гиразы) и IIB (на примере Топо VI)

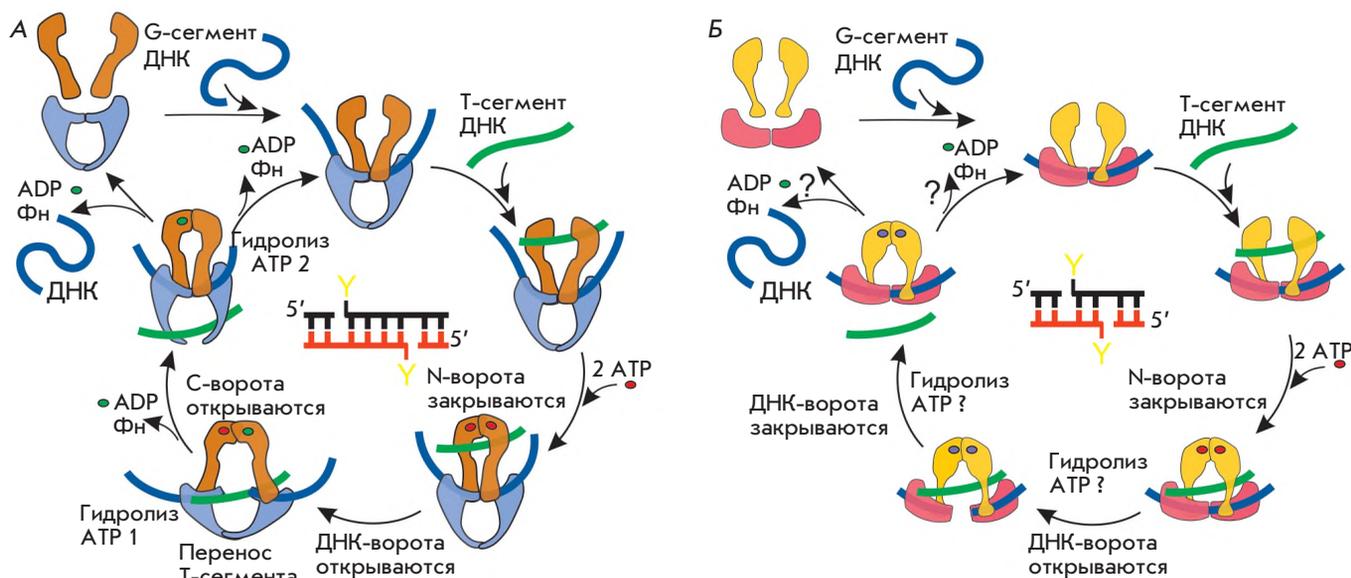


Рис. 3. Каталитические циклы топоизомераз IIA (A) и IIB (B), и влияние топоизомераз на топологию ДНК (B). На схемах показано связывание сегментов ДНК – G-сегмента (синий) и T-сегмента (зеленый); связывание и гидролиз молекул АТР (АТР красный, АDР зеленый, если состояние связанного нуклеотида неизвестно (АТР/АDР), то он отмечен фиолетовым кружком); расщепление и лигирование G-сегмента и перенос T-сегмента сквозь ферментативный комплекс. В центре каталитических циклов показаны схемы расщепления G-сегмента ДНК под действием топоизомеразы (Y – каталитические тирозины WHD-доменов). Топоизомеразы II способны изменять суперспирализацию ДНК, а также разделять (декатенировать) или сцеплять (катенировать) молекулы ДНК

и лигирования G-сегмента в результате гидролиза второй молекулы АТР [26]. Высвобождение молекул АDР, которые имеют гораздо меньшую аффинность к активным центрам, приводит к открытию N-ворот и возвращению фермента в исходное состояние [23].

Считается, что связывание молекул АТР необходимо для направленного переноса T-сегмента ДНК, поскольку сегмент не может покинуть фермент через N-ворота до тех пор, пока не гидролизованы обе молекулы АТР [24]. Следует отметить, что роль

гидролиза АТФ в переносе сегмента окончательно не выяснена. Согласно одной из моделей, последовательный гидролиз двух молекул АТФ способствует перемещению Т-сегмента за счет конформационных перестроек [27, 28]. По другой модели гидролиз необходим только для «перезапуска» фермента и улавливания нового Т-сегмента [29]. Так, например, при добавлении в реакционную смесь негидролизуемого аналога АТФ – ADPNP, топоизомераза способна провести один акт переноса Т-сегмента, после чего фермент остается в неактивном состоянии с закрытыми N-воротами [30]. Согласно недавним исследованиям, проведенным на единичных молекулах ДНК и ДНК-гиразы с использованием магнитных пинцетов, гидролиз АТФ важен как для ускорения переноса Т-сегмента, так и для «перезапуска» фермента [7]. Альтернативное объяснение отводит связыванию АТФ и вызванной этим событием димеризации GNKL-доменов роль предохранителя, который необходим для стабилизации двух половин ферментативного комплекса и предотвращения формирования двухцепочечных разрывов в ходе катализа за счет случайной диссоциации двух половин фермента [8].

Каталитический механизм топоизомераз IIВ считается принципиально сходным с механизмом топоизомераз IIА (рис. 3Б) [31–33]. Но из-за отсутствия С-ворот Т-сегмент после прохождения ДНК-ворот и разрыва G-сегмента сразу покидает ферментативный комплекс [31]. Кроме того, поскольку остатки тирозина WHD-доменов расположены на других элементах вторичной структуры (по сравнению с гомологичными доменами топоизомераз IIА), топоизомеразы IIВ при расщеплении G-сегмента ДНК оставляют дву-, а не четырехнуклеотидные липкие 5'-концы, характерные для топоизомераз IIА [34, 35]. Показано, что расщепление G-сегмента зависит от связывания АТФ, которое считается необходимым для стабилизации комплекса и временного двухцепочечного разрыва [8, 32].

Эволюционные взаимоотношения внутри групп топоизомераз IIА и IIВ и между этими группами остаются предметом дискуссии. Достоверно можно проследить лишь несколько событий, такие, как дубликации гена топоизомеразы IIА у предка бактерий (привела к появлению двух ферментов со специализированными функциями – ДНК-гиразы и Топо IV) и предка позвоночных (появились Top2 α и Top2 β), горизонтальный перенос генов гиразы из разных групп бактерий в архей Euryarchaeota и обратный перенос генов Топо VI, появление в представителях Archaeplastida бактериальной гиразы, унаследованной ими от хлоропластов при установлении первичного эндосимбиоза [10]. В случае более древних событий консенсус отсутствует.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ БАКТЕРИЙ

Как правило, свободноживущие быстрорастущие бактерии, такие, как *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus* и *Bacillus subtilis*, обладают широким набором топоизомераз, в который входят топоизомеразы I и III (принадлежащие к типу I), а также ДНК-гираза и топоизомераза IV (тип II, класс IIА) [4, 36–38]. Медленно растущие бактерии (например, *Mycobacterium tuberculosis*) или симбиотические/паразитические бактерии, для которых характерна редукция генома (например, *Helicobacter pylori*), напротив, часто имеют минимально необходимый набор, состоящий из одной топоизомеразы типа I (топоизомераза I) и одной топоизомеразы типа II (ДНК-гираза) [39, 40]. Более того, обнаружены несколько эндосимбиотических бактерий, например, *Hodgkinia cicadicola* и *Tremblaya princeps*, геномы которых вовсе не содержат генов топоизомераз II либо в них присутствует ген только одной субъединицы, как у *Carsonella ruddii* [41–43]. Эти организмы имеют крайне редуцированные геномы (139–160 т.п.н.), что обусловлено экстремальным приспособлением к паразитизму и эндосимбиозу.

ДНК-гираза и топоизомераза IV являются мишенями многих антибиотиков, которые по механизму действия можно разделить на две группы – яды и каталитические ингибиторы. Яды стабилизируют промежуточный ковалентный комплекс топоизомеразы с G-сегментом ДНК. В дальнейшем случайная диссоциация субъединиц фермента (например, в результате столкновения комплекса топоизомеразы с реплицомой или РНК-полимеразой) вызывает двухцепочечные разрывы ДНК и, как следствие, приводит к гибели клетки. Каталитические ингибиторы не вызывают разрывов в ДНК, однако подавляют активность ферментов, например, за счет связывания с АТФ-азным центром GNKL-домена и конкуренции с АТФ [44, 45].

Ядами для топоизомераз являются, например, препараты группы хинолонов и фторхинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин и др.), часто используемые в клинической практике [44, 46]. С помощью структурных исследований показано, что движение ионов двухвалентных металлов (чаще всего магния) в каталитическом центре топоизомераз необходимо для расщепления и лигирования ДНК. Яды гиразы стабилизируют ион металла в положении, которое способствует расщеплению ДНК, но не лигированию разрыва [47, 48]. Последнее наблюдение позволило объяснить эффекты самых часто возникающих мутаций гиразы, приводящих к антибиотикорезистентности. Оказалось, что консервативные остатки серина и глутамина WHD-домена координируют молекулы воды и ион магния, которые необходимы

для связывания фторхинолонов [47]. Замена хотя бы одного из этих остатков на неполярный приводит к устойчивости бактерий [49].

Классическими каталитическими ингибиторами являются вещества класса аминокумаринов (например, новобиоцин и кумермицин А1), которые конкурируют с АТР за взаимодействие с АТР-азным центром [44, 50]. Подавление активности гиразы приводит к ингибированию репликации и транскрипции, остановке деления клеток. Из-за малой растворимости аминокумаринов и токсичности для человека препараты на их основе в настоящее время не используются в клинической практике, однако применяются в ветеринарии [45].

Распространение устойчивости к антибиотикам делает необходимым активный поиск новых антибактериальных препаратов, проводятся также клинические испытания новых классов веществ, среди которых много ингибиторов топоизомераз [45, 51, 52].

ДНК-гираза

ДНК-гиразы бактерий консервативны и обладают схожим набором свойств (рис. 4А). Уникальная особенность ДНК-гиразы – способность вносить отрицательную суперспирализацию с затратой энергии гидролиза АТР, что показано в экспериментах *in vitro* для ферментов *E. coli*, *B. subtilis*, *C. crescentus*, *M. tuberculosis* и многих других бактерий. Кроме того, ДНК-гираза эффективно релаксирует положительные супервитки и способна декатенировать кольцевые молекулы ДНК [39, 53–56].

ДНК-гираза незаменима для жизнедеятельности бактерий, гены *gyrA* и *gyrB*, кодирующие субъединицы фермента, нельзя удалить, а ингибиторы, снижающие его активность, значительно уменьшают жизнеспособность клеток [57–60]. Ингибирование гиразы вызывает у разных бактерий схожий фенотип – удлиненные клетки, не способные к делению [60, 61].

Считается, что роль гиразы в клетках заключается в поддержании отрицательной суперспирализации генома, что облегчает инициацию транскрипции и репликации, а также в релаксации положительных супервитков перед движущимися полимеразми. Ранние ChIP-chip (иммунопреципитация связанной с белком ДНК с ее последующим анализом на чипе для определения сайтов связывания белка) эксперименты с *E. coli* выявили положительную корреляцию между связыванием гиразы и уровнем транскрипции генов [65]. В дальнейшем при помощи метода Торо-Seq, позволяющего картировать сайты активности топоизомераз с высокой точностью, было прямо показано, что каталитически активная ДНК-гираза *E. coli* расположена в концах активных генов и регионах за сайтом терминации транскрипции [66]. Аналогично,

результаты ChIP-Seq (иммунопреципитация связанной с белком ДНК с ее последующим секвенированием для определения сайтов связывания белка) экспериментов с гиразой *M. tuberculosis* свидетельствуют о преимущественном связывании фермента с транскрипционно активными областями [67]. У *C. crescentus* обнаружен ген *gapR*, подавление экспрессии которого приводит к ингибированию инициации и элонгации репликации и вызывает повышенную чувствительность клеток к ингибиторам гиразы. *In vitro* эксперименты показали, что белок GapR предпочтительно связывается с положительно суперспирализованной ДНК и взаимодействует с гиразой, увеличивая ее способность релаксировать положительные супервитки. Возможно, GapR привлекает гиразу к положительным супервиткам, образующимся перед движущимся репликационным комплексом, способствуя их релаксации и стимулируя репликацию [55]. Эксперименты с единичными молекулами показали, что в отсутствие гиразы транскрипция на топологически закрепленных молекулах быстро замедляется и в конце концов останавливается из-за накопления положительной суперспирализации (рис. 4Б). Присоединение же гиразы к такой молекуле приводит к «транскрипционному всплеску» – быстрому восстановлению нормальной скорости транскрипции [68].

Участие гиразы в процессе транскрипции не ограничивается ее способностью релаксировать положительную суперспирализацию перед РНК-полимеразой в процессе элонгации. Показано, что отрицательная суперспирализация, образованная гиразой, может как активировать, так и подавлять инициацию транскрипции генов [69]. Обнаружено, что до половины генов *E. coli* отвечают изменением уровня транскрипции на релаксацию генома [70, 71]. Онтологический анализ чувствительных к суперспирализации генов *E. coli* выявил, что продукты генов, отвечающих повышением уровня транскрипции на релаксацию отрицательных супервитков, предпочтительно обеспечивают реакции катаболизма (например, ферменты цикла Кребса), а сами гены расположены ближе к терминатору репликации. В то же время гены, для инициации транскрипции которых необходима отрицательная суперспирализация генома, преимущественно относятся к анаболическим процессам (синтез аминокислот, нуклеотидов) и находятся в области ориджина [71, 72]. Согласно модели, во время активного роста культуры *E. coli* за счет работы ДНК-гиразы в геноме формируется градиент отрицательной суперспирализации с максимальным уровнем отрицательной суперспирализации в районе ориджина репликации и минимальным – в районе терминаторов репликации. Это приводит к преимущественной экспрессии

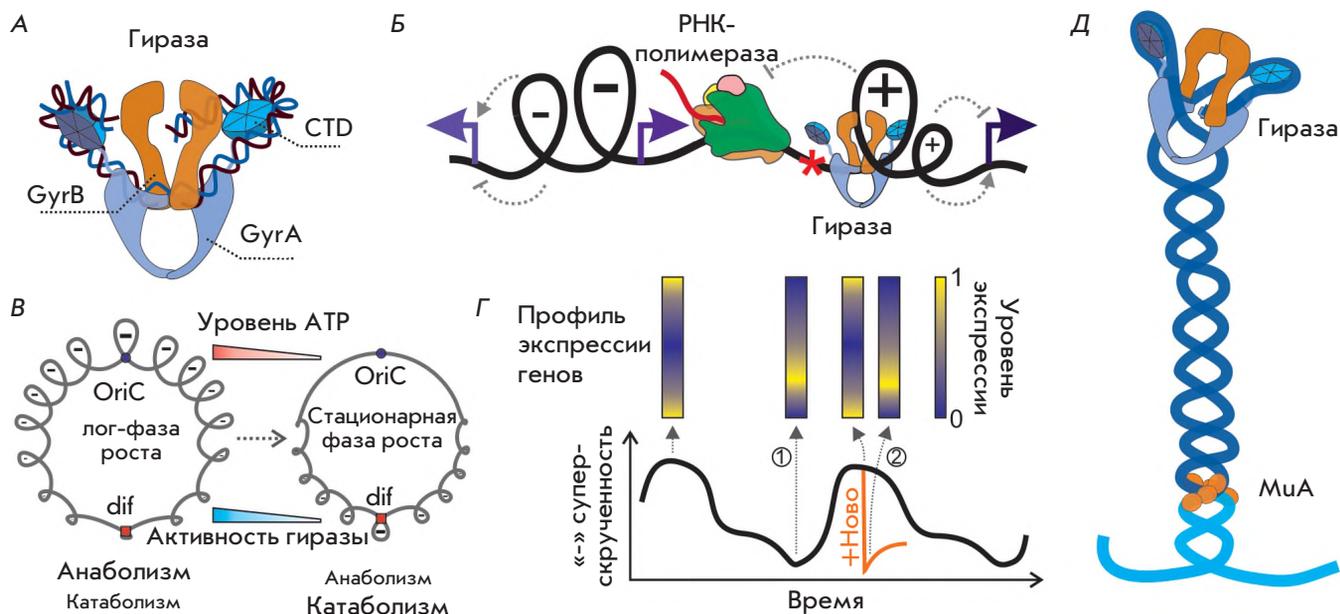


Рис. 4. ДНК-гираза и ее функции. Схема структуры комплекса ДНК-гиразы с ДНК (А). Двухдоменная модель (от англ. twin-domain model), иллюстрирующая формирование положительной суперспирализации перед элонгирующей РНК-полимеразой и отрицательной суперспирализации – позади нее [62]. Положительная и отрицательная суперспирализации, образованные при транскрипции, диффундируют по молекуле ДНК и влияют на инициацию транскрипции с близкорасположенных промоторов (показаны в виде стрелок). В зависимости от промотора эффекты могут быть как активирующими, так и ингибирующими. ДНК-гираза способствует элонгации транскрипции, релаксируя положительные супервитки перед РНК-полимеразой (Б). Предполагается, что изменения суперспирализации генома, происходящие при переходе их экспоненциальной фазы роста культуры *E. coli* в стационарную фазу роста, способствуют переключению физиологического состояния клетки от преимущественно анаболического метаболизма к катаболизму [63]. OriC – ориджин репликации бактериальной хромосомы, dif – сайт, распознающийся рекомбиназами XerC / XerD (В). Циркадные колебания суперспирализации генома цианобактерии *S. elongatus* (внизу) коррелируют с изменениями профиля транскрипции генов (вверху). Резкое падение суперспирализации генома, вызванное ингибитором ДНК-гиразы новобиоцином (показано оранжевой кривой), приводит к быстрому изменению транскрипционного профиля (2), делая его схожим с профилем бактерий, находящихся в фазе релаксации генома (1) [64] (Г). ДНК-гираза необходима для пространственной организации ДНК профага бактериофага Му и его транспозиции. ДНК профага показана темно-синим, ДНК генома бактерии – голубым (Д)

генов, участвующих в процессе анаболизма, что способствует росту и делению клеток. При истощении питательных веществ в стационарной фазе роста культуры *E. coli* происходит уменьшение концентрации АТФ, что вызывает снижение активности ДНК-гиразы. Это приводит к уменьшению уровня суперспирализации генома и, в совокупности с другими факторами, к инверсии градиента суперспирализации хромосомы бактерии, в результате чего преимущественно экспрессируются гены, участвующие в процессах катаболизма [63]. Таким образом *E. coli* использует суперспирализацию для глобальной модуляции транскрипции генов при истощении питательных веществ в среде [72–74] (рис. 4В).

Наиболее изученными промоторами, чувствительными к уровню суперспирализации, являются промоторы генов *gyrA*, *gyrB* и *topA* *E. coli*, которые кодируют субъединицы гиразы и топоизомеразу I. Эти промоторы содержат сенсоры суперспирализации:

транскрипция *gyrA* и *gyrB* активируется при релаксации генома, тогда как *topA* лучше транскрибируется при усилении отрицательной суперспирализации [75, 76]. Таким образом может осуществляться взаимно регулируемый синтез двух топоизомераз, обладающих противоположными активностями, что служит для гомеостатирования уровня суперспирализации генома [77, 78]. Аналогичные наблюдения сделаны для генов топоизомераз *S. coelicolor* и *S. crescentus* [58, 79].

Считается, что у *Salmonella typhimurium* уровень суперспирализации регулирует переход от анаэробного метаболизма к аэробному дыханию [80]. У *H. pylori* отрицательная суперспирализация является важным регулятором синтеза жгутика [81]. Циркадные колебания суперспирализации ДНК цианобактерии *Synechococcus elongatus* коррелируют с изменениями в транскрипции генов. При этом искусственная релаксация отрицательной супер-

спирализации, вызванная добавлением ингибитора ДНК-гиразы новобиоцина, приводит к быстрому изменению транскрипции генов, схожему с физиологическими изменениями в ходе циркадного цикла (рис. 4Г) [64]. Глобальное влияние суперспирализации на активность генов у разных бактерий, отражающееся в устройстве регуляторных областей, позволяет считать ее глобальным фактором транскрипции [63, 69, 72].

Ряд наблюдений указывает на то, что гиразы и вызванная ею отрицательная суперспирализация участвуют в пространственной организации генома бактерий. Так, индуцированное фторхинолонами *in vivo* расщепление гиразой геномной ДНК *E. coli* приводит к образованию фрагментов длиной 50–100 т.п.н., что примерно соответствует длине суперспирализованных доменов хромосомы [82–84]. Показано, что активность ДНК-гиразы на ее высокоаффинном сайте, расположенном в центре профага бактериофага μ , приводит к локальному усилению отрицательной суперспирализации и компактизации участка хромосомы с профагом в виде ДНК-плектонымы, что вызывает сближение концов профага и способствует их рекомбинации вирусной транспозазой μ A [85, 86] (рис. 4Д). Считается, что избыточная отрицательная суперспирализация, накапливающаяся в клетках *E. coli*, мутантных по топоизомеразе I, аналогично приводит к компактизации хромосомы [87]. Ингибирование же гиразы новобиоцином, наоборот, дезорганизует пространственную структуру хромосомы и уменьшает ее компактность, как показали эксперименты Hi-C (метод определения конформации хромосом), проведенные на *S. crescentus* [88]. Следует отметить, что значимых ассоциаций сайтов активности гиразы с границами и расположением топологически ассоциированных доменов генома у *E. coli*, определенных с помощью Hi-C, не обнаружено [66].

Топоизомераза IV

Эксперименты *in vitro* показывают, что топоизомеразы IV (Топо IV) и гиразы, несмотря на структурное сходство, обладают разным спектром активностей. Топо IV способна эффективно релаксировать положительные и (с на порядок меньшей скоростью) отрицательные супервитки, но в отличие от гиразы не может вносить избыточную отрицательную суперспирализацию [55, 56, 89]. Вместе с тем Топо IV – это эффективная декатеназа, разделяющая сцепленные кольцевые молекулы ДНК гораздо лучше, чем гиразы [90–94]. Соответственно, Топо IV, но не гиразы, способна расплетать узловы структуры в молекулах ДНК *in vivo* [95]. Предполагается, что описанные отличия обусловлены строением STD-доменов GyrA-субъединицы гиразы и гомологичной ей ParC Топо IV (рис. 5Б). STD-

домен гиразы обеспечивает оборачивание фрагмента ДНК вокруг фермента, так что G-сегмент ДНК непосредственно переходит в T-сегмент, чем и достигается внутримолекулярное внесение супервитков [7, 96]. STD Топо IV не изгибает G-сегмент, однако улавливает T-сегмент таким образом, чтобы он находился перпендикулярно к G-сегменту, что преимущественно происходит с двумя разными молекулами ДНК, например, катенанами [89, 93, 97] (рис. 4А, рис. 5А).

Топо IV, как и гиразы, необходима для нормального деления бактерий: мутации в генах *parC* и *parE*, кодирующих субъединицы топоизомеразы, или подавление фермента ингибиторами вызывают у ряда бактерий появление так называемого *par*-фенотипа – удлинённые клетки, не способные к делению и содержащие повышенное количество копий неразделённой ДНК [36, 98–101]. При этом отсутствие активности Топо IV не мешает прохождению и окончанию репликации хромосомы *E. coli* [99, 100]. Биохимические свойства фермента позволяют предположить, что основная функция Топо IV в клетке заключается в разделении прекатенанов во время репликации (пересечений между сестринскими молекулами ДНК, возникающими из-за вращения реплисома) и катенанов кольцевых молекул после ее завершения [100, 102]. В соответствии с этой гипотезой Топо IV не является жизненно необходимой для *Streptomyces*, имеющих линейные хромосомы, однако важна для поддержания кольцевых плазмид [38]. Интересно, что *E. coli* с искусственно созданными линейными хромосомами тем не менее проявляют *par*-фенотип при инактивации Топо IV. Это, возможно, свидетельствует о важности своевременного удаления прекатенанов и узлов по всей длине хромосомы бактерии [103]. Повышение уровня экспрессии Топо IV приводит к ускоренному разделению ДНК при делении клеток *E. coli* [100].

Предполагается, что у бактерий, лишенных Топо IV, функцию декатенации берут на себя ДНК-гиразы и топоизомеразы типа I. Так, например, гиразы *M. tuberculosis* является эффективной декатеназой, и она, как показал ChIP-Seq-эксперимент, значительно обогащена в области терминаторов репликации на хромосоме бактерии (у гиразы *E. coli* такого не наблюдается [66]), что свидетельствует в пользу выполнения ею функций Топо IV [39, 67, 104]. Вовлеченность гиразы *H. pylori* в процесс сегрегации хромосом косвенно подтверждается тем, что бактерии с делецией гена *xerH*, кодирующего рекомбиназу, участвующую в разрешении димеров хромосом и, возможно, декатенации, более чувствительны к ингибитору гиразы ципрофлоксацину [99, 105].

Способность Топо IV релаксировать положительные супервитки [56, 89] позволяет рассматривать ее

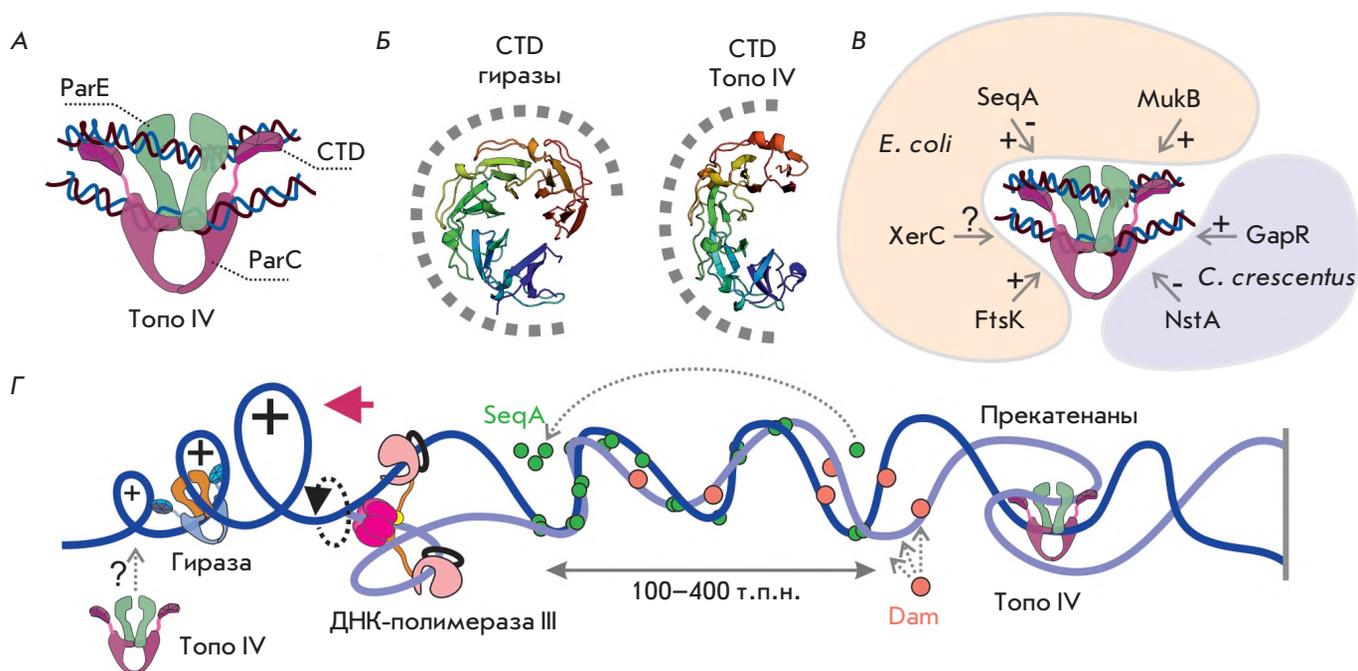


Рис. 5. Топоизомераза IV и ее функции. Схема структуры Топо IV в комплексе с ДНК (А). Сравнение структур С-концевых доменов GyrA гиразы (PDB 1zi0) и ParC Топо IV (PDB 1zvt). Предполагаемое положение ДНК при взаимодействии показано пунктиром (Б). Белки, взаимодействующие с Топо IV. Эффекты, оказываемые белками, показаны символами + (активация), - (ингибирование) и ? (взаимодействие не доказано) (В). Топологические эффекты, возникающие при репликации ДНК (Г). Движущийся репликационный комплекс создает положительные супервитки впереди себя, которые релаксируются ДНК-гиразой и, возможно, Топо IV. Из-за избыточной суперспирализации ДНК репликационный комплекс вращается, создавая прекаatenаны. У *E. coli* с полуметилированными сайтами GATC новореплицированной ДНК связывается белок SeqA. Метилаза Dam метилирует GATC-сайты и вытесняет SeqA, таким образом, градиент концентрации SeqA тянется на 100–400 т.п.н. за репликационным комплексом и движется вместе с ним. Топо IV не может взаимодействовать с ДНК, покрытой SeqA, этим объясняется временная когезия регионов дочерних хромосом после репликации у *E. coli*, однако, когда все сайты GATC метилированы и SeqA больше не связан с ДНК, топоизомераза удаляет прекаatenаны, разделяя дочерние хромосомы [110]

в качестве помощника ДНК-гиразы при удалении положительной суперспирализации, образованной во время транскрипции и репликации [55, 106] (рис. 5Г). Например, обнаружено, что обработка клеток *E. coli* ингибитором РНК-полимеразы рифампицином снижает активность как гиразы, так и Топо IV, по крайней мере на некоторых участках генома [83, 107]. Интересно, что увеличение копийности генов *parC* и *parE*, кодирующих Топо IV, является частой супрессорной мутацией при удалении генов *topA* топоизомеразы I *E. coli* и *B. subtilis*. Считается, что в данном случае Топо IV компенсирует потерю топоизомеразы I и выполняет ее функцию, удаляя отрицательную суперспирализацию [37, 98, 108].

Топо IV взаимодействует с рядом белков, имеющих совершенно разные функции и структуры и участвующих в организации и разделении реплицированных хромосом: у *E. coli* это белок SeqA, который связывается с полуметилированными сайтами GATC в непосредственной близости от репликомы [109, 110], когезиновый комплекс MukBEF [111, 112],

ДНК-транслоказа FtsK [113] и, вероятно, рекомбиназа XerC [107, 114] (*puc. 5B*). Топо IV *C. crescentus* взаимодействует с белками GapR и NstA, первый из которых стимулирует активность фермента, а второй ее подавляет [55, 115]. *In vivo* Топо IV и когезиновый комплекс MukBEF *E. coli* образуют в клетке кластеры, состоящие из ~15 молекул топоизомеразы и ~10 молекул когезинов [116, 117]. Данные кластеры колокализируются с ориджинами репликации, определяют их положение в клетке и необходимы для расхождения ориджинных дочерних хромосом при делении [116, 118, 119]. Топо IV *C. crescentus* также необходима для правильного перемещения одного из ориджинных к противоположному полюсу клетки [101].

Топоизомераза NM

У *M. smegmatis* обнаружена уникальная топоизомераза типа II, названная ТопоNM [120]. Она состоит из двух субъединиц (ТопоN и ТопоM), гомологичных субъединицам ParE/GyrB и ParC/GyrA топоизомеразы IV и гиразы соответственно. Согласно фило-

генетическому анализу аминокислотных последовательностей, ТороNM отстоит от всех известных топоизомераз IIА, что свидетельствует о ранней дивергенции генов ферментов [120]. ТороNM обладает пониженной чувствительностью к фторхинолонам и кумаринам. Фермент релаксирует положительные и отрицательные супервитки и декатенирует кольцевые молекулы ДНК, что типично для топоизомераз типа II. ТороNM отличает способность вносить положительные супервитки в релаксированные плазмиды [120]. Кроме ТороNM, подобной активностью обладает только «обратная гираза» – топоизомераза типа I, способная вносить положительные супервитки с затратой энергии гидролиза АТФ [121]. Функции и механизм внесения положительных супервитков топоизомеразой ТороNM неизвестны. Предполагается, что ТороNM необходима для сегрегации хромосом. У *M. smegmatis* обнаружена необычная система защиты от мобильных генетических элементов, состоящая из генов, кодирующих конденсин-подобный комплекс, который препятствует эффективной трансформации бактерий плазмидами [122, 123]. ТороNM может быть частью данной системы защиты, поскольку некоторые когезины бактерий взаимодействуют с топоизомеразой [111, 112, 124]. Отсутствие ТороNM у других, в том числе родственных, бактерий и значительная дивергенция аминокислотных последовательностей от других топоизомераз II, возможно, указывают на вирусное происхождение фермента, гены которого попали в *M. smegmatis* горизонтальным переносом.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ АРХЕЙ

Представители домена Archaea обычно содержат топоизомеразы класса IIB – Топо VI. Некоторые представители архей из группы Euryarchaeota потеряли гены Топо IV, но содержат гены ДНК-гиразы, независимо полученные от разных групп бактерий в ходе горизонтального переноса генов [11]. У гипертермофильных архей в качестве приспособления к высоким температурам есть «обратная гираза». Считается, что «обратная гираза» нужна для поддержания стабильности дуплекса ДНК при высоких температурах и участвует в процессах репарации [125–127].

Топоизомераза VI

Впервые топоизомеразу VI (Топо VI) обнаружили у гипертермофильной археи *Sulfolobus shibatae* [128], а затем и у большинства архей, кроме ряда представителей группы Thermoplasmatales, у которых она замещена ДНК-гиразой [11]. *In vitro* Топо VI способна релаксировать как положительные, так и отрицательные супервитки, а также проявляет декатеназную активность [32, 129]. На основании био-

химических данных и структурного анализа предполагается, что каталитический механизм Топо VI схож с действием топоизомераз класса IIА, несмотря на значительные отличия на уровне аминокислотных последовательностей между двумя группами белков (например, каталитический остаток тирозина WHD-домена расположен на другом элементе вторичной структуры) [32, 33, 130] (рис. 2, рис. 3Б).

Физиологическая роль Топо VI не выяснена. Совокупность *in vitro* активностей фермента, а также принципиальная возможность заместить эту топоизомеразу ДНК-гиразой указывает на то, что Топо VI, вероятно, необходима для декатенации реплицированных хромосом, а также для релаксации супервитков, образуемых при транскрипции и репликации [129]. Замечено, что уровень Топо VI у *S. islandicus* увеличивается через 7 ч после перемещения культуры клеток на температуру выше оптимальной. Что, как предполагается, компенсирует рост активности «обратной гиразы» в этих условиях [131].

ДНК-гираза

Гены гиразы обнаружены у представителей нескольких групп Euryarchaeota [11]. Как и бактериальная гираза, топоизомераза архей чувствительна к кумаринам и хинолонам [132–134]. В экспериментах *in vitro* показано, что гираза из *Thermoplasma acidophilum* обладает типичным спектром активностей – она способна релаксировать положительные супервитки, вносить отрицательные супервитки и декатенировать кольцевые молекулы ДНК [134]. Подавление активности гиразы добавлением новобиоцина к культуре клеток *Halobacterium halobium* приводит к остановке репликации ДНК, а также к значительному снижению уровня транскрипции и трансляции [132]. Считается, что гираза архей выполняет типичные для этого фермента функции – релаксацию положительных супервитков, возникающих при транскрипции и репликации, а также декатенацию сцепленных молекул ДНК при делении.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ ЭУКАРИОТ

Все известные эукариоты содержат гомодимерную топоизомеразу IIА (Top2), которая у большинства видов кодируется одним геном (Top2), однако, у позвоночных обнаружены два гена-паралога – Top2 α и Top2 β [10]. Представители Archaeplastida, а также связанные с ними вторичным эндосимбиозом пластид группы эукариот (Alpicomplexa и др.) содержат гены ДНК-гиразы. Фермент имеет бактериальное происхождение и кодируется ядерными генами, перенесенными из генома хлоропластов после установления эндосимбиоза [11, 135]. Субъединицы Топо VI Archaea гомологичны белкам эукариот, которые входят в со-

став комплекса, необходимого для внесения разрывов в ДНК при мейотической рекомбинации (Spo11 – гомолог А-субъединицы, Rec102/Rec6/MEI-P22 – гомологи В-субъединицы) [128, 136, 137]. Так как эти белки не относятся к топоизомеразам, мы не будем подробно их рассматривать. Отличительной особенностью Archaeplastida является полноразмерная гетеротетрамерная Топо VI, обладающая типичными для топоизомераз ферментативными активностями [138].

Большинство агентов, используемых в химиотерапии опухолей, наиболее распространенный из которых – этопозид, являются ядами топоизомераз [139–145]. Они вызывают апоптотическую гибель клетки за счет индукции двухцепочечных разрывов ДНК [146–151]. Селективное действие этих препаратов обусловлено характеристиками опухолевых клеток – неопластические клетки активно пролиферируют, и в них повышен уровень экспрессии топоизомераз [152]. Актуальная проблема химиотерапии – тяжелые побочные эффекты, вызванные повреждением ДНК нормальных клеток, особенно активно пролиферирующих [153, 154]. Разрывы ДНК, опосредованные Top2, могут приводить к хромосомным транслокациям [155] и индуцировать вторичную малигнизацию, например, терапия с использованием этопозида часто приводит к развитию лейкозов [156–158]. Необходимо отметить, что онкогенные эффекты часто связаны с ингибированием Top2 β , которая ассоциирована с промоторными областями генов и активно экспрессируется в большинстве тканей [159–163]. Возможным решением этой проблемы может быть поиск и использование селективных ингибиторов, направленных только против Top2 α .

Каталитические ингибиторы Top2 (мербарон, сурамин, производные бисдиоксипиперазина – ICRF-187) не получили широкого применения в клинической практике в качестве противоопухолевых препаратов [164], однако, некоторые из них используются в качестве кардиопротекторов при терапии ядами Top2 [165, 166]. По одной из гипотез протекторные свойства ингибиторов связаны со снижением количества ковалентных комплексов и, соответственно, разрывов ДНК из-за подавления активности Top2 [167, 168].

Top2

Top2 эукариот, типичный представитель класса IIА, способна релаксировать положительные и отрицательные супервитки, а также декатенировать молекулы ДНК [169–172].

Эффект инактивации Top2 чаще всего проявляется в виде нарушения конденсации хроматина, изменении морфологии хромосом, хромосомных перестройках, нарушении эмбриогенеза и развития нервной системы у позвоночных [170, 173–180].

Top2 эукариот локализована в ядре, однако показана также локализация этого фермента в митохондриях клеток млекопитающих [181]. Повышенный уровень экспрессии гена *Top2* (*Top2 α* позвоночных) характерен для активно пролиферирующих тканей, в которых этот фермент необходим для конденсации и разделения хромосом в процессе митоза [182, 183]. Уровень экспрессии гена *Top2 β* в меньшей степени зависит от типа ткани [184].

STD Top2 наименее консервативен, он служит мишенью посттрансляционных модификаций, в частности, фосфорилирования, уровень которого меняется в течение клеточного цикла. Различия между STD Top2 α и Top2 β определяют функциональную разницу паралога и особенности их регуляции [185]. Так, STD-домен Top2 α (STD α) необходим для связывания с хромосомами во время митоза, а топоизомеразы с STD α нужна для пролиферации клеток, что показано при изучении свойств химерных ферментов: Top2 α с STD от Top2 β и *vice versa* [186]. Показано, что STD-домен Top2 β снижает аффинность топоизомеразы к ДНК и уменьшает эффективность катализа [187, 188].

Top2 необходима для транскрипции высокоактивных и, особенно, длинных генов, во время которой она, как считается, релаксирует положительные супервитки перед полимеразой (*рис. 6А*) [189–193]. Кроме того, Top2 привлекает РНК-полимеразу II на промоторы генов [194, 195] и важна для инициации транскрипции некоторых индуцибельных генов дрожжей (*рис. 6Б*) [196]. Обнаружено, что индукция экспрессии генов, регулируемых ядерными рецепторами (андрогенов, эстрогенов, глюкокортикоидов), связана со сборкой на промоторах комплекса, в который вовлечены хроматинре моделирующие белки (BRG1), компоненты системы репарации разрывов (PARP1, Ku70), а также Top2 β [197–200]. Считается, что данный комплекс в ответ на гормоны вносит двухцепочечный разрыв в ДНК за счет Top2 β , и этот разрыв необходим для эффективной релаксации супервитков при транскрипции (*рис. 6Г*). Аналогичные данные об активирующем эффекте разрывов, внесенных Top2 β , получены для ряда генов в нейронах, стимулированных NMDA [201].

Исследования пространственной организации хроматина показали, что геном эукариот, за редким исключением, организован в топологически ассоциированные домены (ТАДы) [202–204]. С границами ТАДов ассоциированы архитектурные белки, в частности CTCF и когезин [205, 206]. С помощью методов ChIP-Seq и ChIP-exo (ChIP-Seq, точность которого повышена за счет обработки ДНК-белковых комплексов экзонуклеазой) обнаружена колокализация этих белков и Top2 β на границах ТАДов (*рис. 6В*) [207]. Кроме того, картирование сайтов расщепления

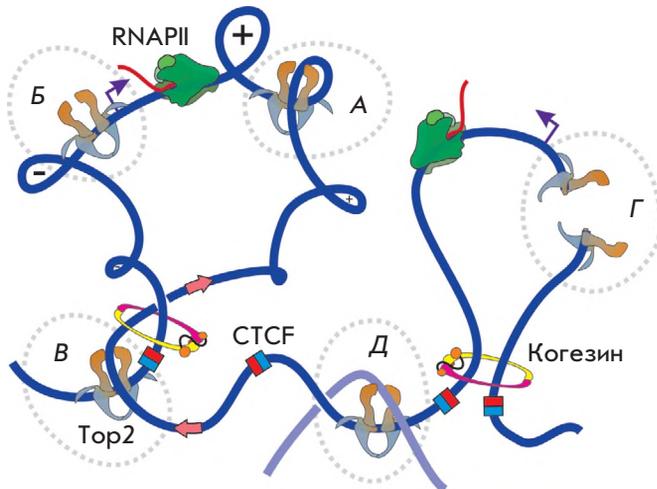


Рис. 6. Функции Top2 эукариот. Релаксация супервитков в ходе транскрипции генов. Промоторы показаны фиолетовыми стрелками (А). Участие в инициации транскрипции (Б). Колокализация Top2, CTCF и когезина у границ топологически ассоциированных доменов. Розовые стрелки на ДНК иллюстрируют процесс экструзии петли под действием CTCF и когезина. Сайты связывания CTCF показаны красно-синими квадратами. Top2 облегчает транслокацию ДНК когезином, релаксируя топологический стресс (В). Индукция транскрипции гена путем внесения разрыва в промоторной области (Г). Декатенация ДНК дочерних хромосом (Д)

ДНК Top2 под действием этопозида (яда топоизомеразы) показало, что они преимущественно находятся рядом с сайтами связывания CTCF [208–211]. Предполагается, что ТАДы образованы петлями, которые, согласно механизму экструзии хроматиновых петель, формируются за счет деятельности когезина и CTCF [212–214]. Предполагается, что Top2 играет важную роль в функционировании хроматиновых петель и необходима для снятия топологического стресса на границах ТАДов (рис. 6В). Существует гипотеза, что компактность ТАДов может поддерживаться за счет отрицательной суперспирализации ДНК, что позволяет рассматривать ее в качестве универсального фактора, организующего ДНК прои эукариот в пространстве [215].

Обнаружено, что Top2 взаимодействуют также с компонентами АТР-зависимых хроматинремоделирующих комплексов [171, 216–218], которые осуществляют сборку и перемещение нуклеосом по ДНК и замену канонических гистонов на варианты формы, поддерживая тканевую специфичность структуры хроматина [219–221]. Взаимодействие Top2 с ремоделирующими комплексами влияет на каталитические свойства топоизомеразы, а также на способность связываться с ДНК [171, 222], что, вероятно, необходимо для структурных перестроек хроматина. Предполагается, что комплексы, ремоделирующие

хроматин, могут привлекать топоизомеразы и CTCF к границам ТАДов [223]. На данный момент взаимосвязь изменений структуры хроматина и активности Top2 недостаточно изучена и требует детализированного анализа в дальнейших исследованиях.

ДНК-гираза

Гириза эукариот, как и фермент бактерий, способна вносить отрицательные супервитки *in vitro* и чувствительна к кумаринам и хинолонам [224–226]. Гены гиразы растений способны комплементировать мутации фермента *E. coli* [225, 227, 228].

В ядерном геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружен один ген субъединицы GYRA и три гена-паралог, кодирующие GYRB-субъединицы гиразы [225]. Показано, что AtGYRA взаимодействует с AtGYRB1 и AtGYRB2 (и такие комплексы способны вносить отрицательную суперспирализацию), но не взаимодействует с AtGYRB3 [228, 229]. Субъединицы содержат сигнальные пептиды, которые отвечают за локализацию AtGYRA в митохондриях и хлоропластах, AtGYRB1 – в хлоропластах, а AtGYRB2 – в митохондриях, поэтому считается, что в хлоропластах функционирует комплекс AtGYRA:AtGYRB1, а в митохондриях – AtGYRA:AtGYRB2. У субъединицы AtGYRB3 не обнаружен канонический сигнальный пептид, однако предсказано, что белок может иметь ядерную локализацию [225, 228] (рис. 7). У *N. benthamiana* известен один ген GYRA и два гена GYRB, при этом субъединицы GYRA и GYRB1 локализованы в хлоропластах и митохондриях [227]. Схожие результаты получены для GYRA-субъединицы гороха *Pisum sativum* [230].

У растений ингибирование гиразы в первую очередь затрагивает хлоропласты и митохондрии. Так, обработка клеток водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* ингибиторами фермента (налидиксовая кислота, новобиоцин) приводит к изменению транскрипции в хлоропластах [224], а добавление налидиксовой кислоты к культуре клеток высшего растения *Nicotiana tabacum* подавляет синтез ДНК в хлоропластах [231]. Ингибиторы гиразы вызывают уменьшение числа хлоропластов и митохондрий, изменяют структуру хлоропластов и, вероятно, нарушают их деление [229]. Выращивание растений на питательных средах, содержащих ингибиторы гиразы, или обработка этими веществами растений *A. thaliana* замедляет их рост и индуцирует этиоляцию, что приводит в итоге к гибели растений [225, 229]. Аналогичные результаты получены с помощью подавления экспрессии генов гиразы вирус-индуцированным сайленсингом (VIGS) у растений *N. benthamiana* и РНК-интерференцией у *A. thaliana* [227, 229]. На основании этих данных можно заклю-

чить, что в растениях фермент, вероятно, сохранил свои роли, характерные для бактерий, он необходим для сегрегации ДНК двумембранных органелл, их деления и транскрипции их генов.

Неизвестной остается роль субъединицы AtGYRB3. Этот полипептид не обладает некоторыми консервативными для топоизомераз типа II аминокислотными мотивами в АТФ-азном домене, но при этом содержит не встречающийся в других топоизомеразах SANT-домен, который известен своей способностью связываться с гистонами [228, 232]. Анализ экспрессии гена AtGYRB3 у *A. thaliana* выявил отсутствие корреляции с экспрессией других генов гиразы: наибольший уровень экспрессии AtGYRB3 обнаружен в тычинках и пыльце, тогда как экспрессия остальных субъединиц активнее всего в семенах и апикальной меристеме побега. Мы предполагаем, что белок AtGYRB3 может принимать участие в мейозе, где assisteрует Топо VI или SPO11.

С помощью BiFC (бимолекулярная комплементация флуоресценции) и коиммунопреципитации выявлено взаимодействие между РНКазой H1 (AtRNH1C), разрушающей РНК из гетеродуплексов РНК-ДНК (R-петли), сформированных в процессе транскрипции, и субъединицей ДНК-гиразы AtGYRA в хлоропластах *A. thaliana* [233]. Высказано предположение, что взаимодействие ферментов способствует преодолению репликационной вилкой R-петель, которые часто возникают в активно транскрибируемых регионах генома хлоропластов, например в генах рРНК.

Топоизомераза VI

Среди эукариот полноразмерная гетеротетрамерная Топо VI обнаружена только у представителей Archaeplastida [138]. Как и в случае с гиразой, растения содержат несколько генов-паралогов, кодирующих субъединицы Топо VI, – у *A. thaliana* обнаружен один ген В-субъединицы (AtTOP6B) и три гена А-субъединиц AtSPO11-1,2,3, а у *Oryza sativa* найдено пять генов-паралогов А-субъединиц и один ген В-субъединиц [138, 234, 235]. Субъединицы Топо VI растений локализованы в ядре, что было предсказано биоинформатически и подтверждено микроскопией [234, 236, 237].

С помощью двугибридного анализа и коиммунопреципитации установлено, что не все А-субъединицы образуют комплекс с В-субъединицей: у *A. thaliana* AtTOP6B взаимодействует с AtSPO11-2 и AtSPO11-3, но не с AtSPO11-1, OsTOP6B *O. sativa* взаимодействует с OsSPO11-2, OsSPO11-3 и OsSPO11-4, но не с OsSPO11-1 и OsSPO11-5 [138, 234, 235]. А-субъединицы, не взаимодействующие с В, вероятно, выполняют функции белков Spo11

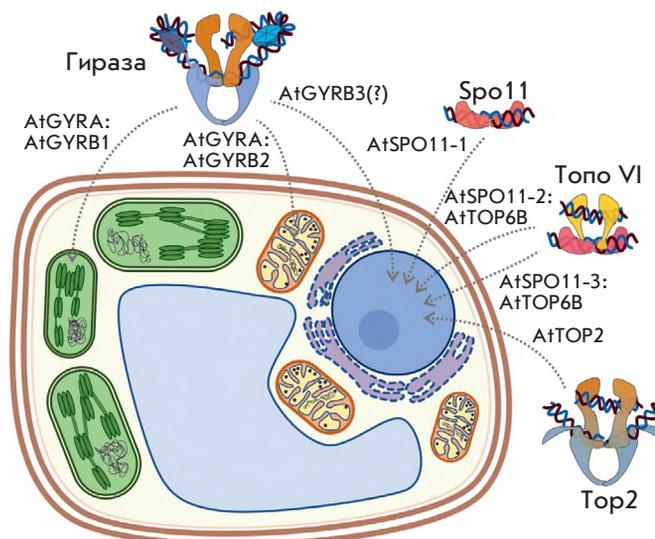


Рис. 7. Клеточная локализация топоизомераз II и гомологичных белков у *A. thaliana*

у других эукариот, так, например, AtSPO11-1 и OsSPO11-1 необходимы для мейотической рекомбинации [238, 239]. OsSPO11-4, хотя и взаимодействует с OsTOP6B, также необходима для мейоза в пыльцевых зернах, поэтому одна из функций Топо VI растений может заключаться в участии в этом процессе [235].

Мутации или подавление экспрессии генов субъединиц Топо VI, которые образуют полноразмерную топоизомеразу и не участвуют в мейотической рекомбинации, вызывают карликовость у растений и уменьшение размера клеток. Такие растения лишены трихом и корневых волосков [237, 240, 241]. Показано, что у мутантов нарушена эндоредупликация – процесс полиплоидизации соматических клеток, который в норме происходит в клетках растений [237, 241]. Обнаружено, что для эффективного выполнения своих функций Топо VI образует комплекс с белками MID, RHL1 и BIN4 (интересно, что RHL1 и BIN4 имеют отдаленное сходство с последовательностью CTD Top2α позвоночных) [237, 242, 243]. Считается, что этот комплекс участвует в регуляции циклов эндоредупликации и, вероятно, принимает участие в декатенировании хромосом при достижении клетками высокой плоидности [236, 237, 242, 243].

Сверхэкспрессия компонентов Топо VI ряда растений в *A. thaliana* увеличивает плоидность клеток и значительно стимулирует устойчивость организмов к стрессовым условиям – повышенному содержанию соли и засухе, а также снижает чувствительность растений к абсцизовой кислоте (гормон стресса растений) [234, 241]. При сверхэкспрессии генов топоизомеразы изменяется уровень большого количества транскриптов, например, активируются каскады ответа на стресс [234]. Обнаружено, что Топо VI

участвует также в ответе растений на окислительный стресс, связываясь с промоторами некоторых генов [244]. Остается неизвестным механизм, за счет которого Топо VI влияет на транскрипцию генов – связано ли это с релаксацией супервитков, внесением разрывов в ДНК, подобно Топ2 β , или вызвано ремоделированием хроматина? Кроме того, не ясно, как связаны процессы, в которых участвует Топо VI, – эндоредупликация и ответ на стресс.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ ВИРУСОВ И МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Топ2-подобные топоизомеразы

Вирусы с крупным двухцепочечным ДНК-геномом (например, Т4-подобные вирусы и NCLDV – крупные ядерно-цитоплазматические ДНК-содержащие вирусы) имеют собственные Топ2-подобные ферменты [11]. Топоизомеразы NCLDV (вирусы эукариот), возможно, являются сестринской группой Топ2 хозяев. Филогенетическое положение топоизомераз группы бактериофагов Т4 менее определено, по аминокислотным последовательностям они одинаково не похожи на топоизомеразы ПА бактерий и эукариот [11]. Тем не менее, топоизомеразы этих вирусов консервативны по своей структуре и активностям – фермент бактериофага Т4, хотя и кодируется тремя генами, релаксирует супервитки и декатенирует кольцевые ДНК, а также чувствителен к некоторым ингибиторам Топ2 [245, 246]. Считается, что топоизомеразы необходимы для удаления положительной суперспирализации, возникающей при репликации генома вирусов [247, 248].

ДНК-гираза

В геноме гигантского бактериофага AR9 и ряда родственных вирусов из группы Мувирidae предсказаны гены ДНК-гиразы [249]. Функции и роль данного фермента не известны.

Топоизомераза VIII

В некоторых плаزمиде архей и бактерий, а также в интегрированных в геном мобильных генетических элементах обнаружены гены топоизомераз, в которых предсказаны домены, схожие с доменами Топо VI. Топоизомеразы, кодируемые этими генами, выделены в отдельную группу ПВ топоизомераз и названы Топо VIII [250, 251]. Для ряда Топо VIII показана способность релаксировать суперспирализованные плазмиды и проводить декатенацию кольцевых молекул ДНК [250]. Недавно была описана новая группа белков, гомологичных А-субъединице Топо VIII, названная Mini-A за сравнительно небольшие размеры полипептидов (рис. 2) [251]. Функция этих топоизомераз неизвестна, вероятно, они способствуют поддержанию и распространению плазмид в клетках хозяев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Топоизомеразы разрешают топологические проблемы, возникающие из-за спиральности ДНК. Эти ферменты широко распространены и необходимы для прохождения фундаментальных клеточных процессов. Согласно одной из гипотез, топоизомеразы возникли и прошли ранние этапы своей эволюции в вирусах, где и образовали все известные на сегодня группы еще во времена LUCA. При разделении клеточных организмов на современные домены вирусы распространяли, переносили и перемешивали гены топоизомераз [11, 250]. Вполне вероятно, что известное разнообразие топоизомераз является лишь вершиной айсберга и по мере изучения «темной материи вирусов» будут открыты новые типы и классы ферментов с необычными свойствами. ●

Подготовка обзора поддержана Соглашением с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1661, а также при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90069.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crick F.H.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 8. P. 2639–2643.
2. Mirkin S. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2001.
3. Bates A., Maxwell A. DNA topology. Second Ed. Oxford: Oxford University Press, 2005.
4. Maxwell A., Bush N.G., Evans-Roberts K. // EcoSal Plus. 2015. V. 6. № 2. P. 1–34.
5. Seol Y., Neuman K.C. // Biophys. Rev. 2016. V. 8. P. 101–111.
6. Bizard A.H., Hickson I.D. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 7138–7153.
7. Basu A., Hobson M., Lebel P., Fernandes L.E., Tretter E.M., Berger J.M., Bryant Z. // Nat. Chem. Biol. 2018. V. 14. № 6. P. 565–574.
8. Bates A.D., Berger J.M., Maxwell A. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 15. P. 6327–6339.
9. Brown P.O., Cozzarelli N.R. // Science. 1979. V. 206. № 4422. P. 1081–1083.
10. Forterre P., Simonetta G., Daniele G., Serre M.-C. // Biochimie. 2007. V. 89. P. 427–446.
11. Forterre P., Gabelle D. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. № 3. P. 679–692.
12. Dutta R., Inouye M. // TIBS. 2000. V. 25. P. 24–28.
13. Broeck A.V., Lotz C., Ortiz J., Lamour V. // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 4935.
14. Schmidt B.H., Burgin A.B., Deweese J.E., Osheroff N., Berger J.M. // Nature. 2010. V. 465. № 7298. P. 641–644.
15. Berger J.M., Gambling S., Harrison S., Wang J.C. // Nature. 1996. V. 379. № 18. P. 225–232.
16. Clarke D.J., Azuma Y. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 2438. P. 1–14.
17. Vos S.M., Lee I., Berger J.M. // J. Mol. Biol. 2014. V. 425. № 17. P. 1–26.

18. McClendon A.K., Gentry A.C., Dickey J.S., Brinch M., Bendson S., Andersen A.H., Osheroff N. // *Biochemistry*. 2009. V. 47. № 50. P. 13169–13178.
19. Morais Cabral J.H., Jackson A.P., Smith C.V., Shikotra N., Maxwell A., Liddington R.C. // *Nature*. 1997. V. 388. № 6645. P. 903–906.
20. Vologodskii A.V., Zhang W., Rybenkov V.V., Podtelezhnikov A.A., Subramanian D., Griffith J.D., Cozzarelli N.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 6. P. 3045–3049.
21. Dong K.C., Berger J.M. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7173. P. 1201–1205.
22. Vologodskii A. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 10. P. 3125–3133.
23. Gubaev A., Klostermeier D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 34. P. 14085–14090.
24. Roca J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 24. P. 25783–25788.
25. Gubaev A., Klostermeier D. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 16. P. 130–141.
26. Rudolph M.G., Klostermeier D. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 15. P. 2632–2640.
27. Basu A., Parente A.C., Bryant Z. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 9. P. 1833–1845.
28. Baird C.L., Harkins T.T., Morris S.K., Lindsley J.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 24. P. 13685–13690.
29. Sugino A., Higgins N.P., Brown P.O., Peebles C.L., Cozzarelli N.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. № 10. P. 4838–4842.
30. Bates A.D., O’Dea M.H., Gellert M. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 5. P. 1408–1416.
31. Corbett K.D., Berger J.M. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 1. P. 151–163.
32. Corbett K.D., Benedetti P., Berger J.M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. № 7. P. 611–619.
33. Graille M., Cladie L., Durand D., Lecointe F., Gadelle D., Quevillon-Cheruel S., Vachette P., Forterre P., van Tilbeurgh H. // *Structure*. 2008. V. 16. № 3. P. 360–370.
34. Buhler C., Lebbink J.H.G., Bocs C., Ladenstein R., Forterre P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 40. P. 37215–37222.
35. Morrison A., Cozzarelli N.R. // *Cell*. 1979. V. 17. № 1. P. 175–184.
36. Ward D., Newton A. // *Mol. Microbiol.* 1997. V. 26. № 5. P. 897–910.
37. Reuß D.R., Faßhauer P., Mroch P.J., Ul-Haq I., Koo B.M., Pöhlein A., Gross C.A., Daniel R., Brantl S., Stülke J. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 10. P. 5231–5242.
38. Huang T.W., Hsu C.C., Yang H.Y., Chen C.W. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 22. P. 10403–10413.
39. Aubry A., Mark Fisher L., Jarlier V., Cambau E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 348. № 1. P. 158–165.
40. Ambur O.H., Davidsen T., Frye S.A., Balasingham S.V., Lagesen K., Rognes T., Tønjum T. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. № 3. P. 453–470.
41. McCutcheon J.P., McDonald B.R., Moran N.A. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 7. P. 1–11.
42. López-Madrigal S., Latorre A., Porcar M., Moya A., Gil R. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 19. P. 5587–5588.
43. Tamames J., Gil R., Latorre A., Peretó J., Silva F.J., Moya A. // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. № 181. P. 1–7.
44. Collin F., Karkare S., Maxwell A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 92. № 3. P. 479–497.
45. Dighe S.N., Collet T.A. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 199. № 8. P. 1–100.
46. Hooper D.C., Jacoby G.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 9. P. 1–22.
47. Wohlkonig A., Chan P.F., Fosberry A.P., Homes P., Huang J., Kranz M., Leydon V.R., Miles T.J., Pearson N.D., Perera R.L., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. № 9. P. 1152–1153.
48. Bax B.D., Chan P.F., Eggleston D.S., Fosberry A., Gentry D.R., Gorrec F., Giordano I., Hann M.M., Hennessy A., Hibbs M., et al. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7309. P. 935–940.
49. Aldred K.J., McPherson S.A., Turnbough C.L., Kerns R.J., Osheroff N. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 8. P. 4628–4639.
50. Alt S., Mitchenall L.A., Maxwell A., Heide L. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2011. V. 66. № 9. P. 2061–2069.
51. Butler M.S., Paterson D.L. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2020. V. 2019. № 10. P. 329–364.
52. Lewis K. // *Cell*. 2020. V. 181. № 1. P. 29–45.
53. Weidlich D., Klostermeier D. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 8. P. 2299–2312.
54. Rovinskiy N.S., Agbleke A.A., Chesnokova O.N., Patrick Higgins N. // *Microorganisms*. 2019. V. 7. № 3. P. 1–22.
55. Guo M.S., Haakonsen D.L., Zeng W., Schumacher M.A., Laub M.T. // *Cell*. 2018. V. 175. № 2. P. 583–597.
56. Ashley R.E., Dittmore A., McPherson S.A., Turnbough C.L., Neuman K.C., Osheroff N. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 16. P. 9611–9624.
57. Grompone G., Ehrlich S.D., Michel B. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 3. P. 845–854.
58. Rizzo M.F., Shapiro L., Gober J. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 21. P. 6970–6981.
59. Ogasawara N., Seiki M., Yoshikawa H. // *Nature*. 1979. V. 281. № 5733. P. 702–704.
60. Guha S., Udupa S., Ahmed W., Nagaraja V. // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. № 24. P. 4986–5001.
61. Nakanishi A., Oshida T., Matsushita T., Imajoh-Ohmi S., Ohnuki T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 4. P. 1933–1938.
62. Wu H.Y., Shyy S., Wang J.C., Liu L.F. // *Cell*. 1988. V. 53. № 3. P. 433–440.
63. Travers A., Muskhelishvili G. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. № 2. P. 157–169.
64. Vijayan V., Zuzow R., O’Shea E.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 52. P. 22564–22568.
65. Jeong K.S., Ahn J., Khodursky A.B. // *Genome Biol.* 2004. V. 5. № 11. P. 1–10.
66. Sutormin D., Rubanova N., Logacheva M., Ghilarov D., Severinov K. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 3. P. 1–16.
67. Ahmed W., Sala C., Hegde S.R., Jha R.K., Cole S.T., Nagaraja V. // *PLoS Genet.* 2017. V. 13. № 5. P. 1–20.
68. Chong S., Chen C., Ge H., Xie X.S. // *Cell*. 2015. V. 158. № 2. P. 314–326.
69. Dorman C.J. // *BMC Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 1–9.
70. Peter B.J., Arsuaga J., Breier A.M., Khodursky A.B., Brown P.O., Cozzarelli N.R. // *Genome Biol.* 2004. V. 5. № 11. P. 1–16.
71. Blot N., Mavathur R., Geertz M., Travers A., Muskhelishvili G. // *EMBO Rep.* 2006. V. 7. № 7. P. 710–715.
72. Sobetzko P., Travers A., Muskhelishvili G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 2. P. E42–E50.
73. Martis B.S., Forquet R., Reverchon S., Nasser W., Meyer S. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 1047–1055.
74. Muskhelishvili G., Forquet R., Reverchon S., Nasser W., Meyer S. // *Microorganisms*. 2019. V. 7. № 12. P. 10–15.
75. Pruss G.J., Drlica K. // *Cell*. 1989. V. 56. № 2. P. 521–523.
76. Ahmed W., Menon S., Karthik P.V.D.N.B., Nagaraja V. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 44. № 4. P. 1541–1552.
77. Menzel R., Gellert M. // *Cell*. 1983. V. 34. № 8. P. 105–113.
78. Drlica K. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. № 4. P. 425–433.
79. Szafran M.J., Gongerowska M., Gutkowski P., Zakrzewska-Czerwin J., Jakimowicz D. // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. № 21. P. 3016–3028.
80. Yamamoto N., Droffner M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 7. P. 2077–2081.

81. Ye F., Brauer T., Niehus E., Drlica K., Josenhans C., Suerbaum S. // *Int. J. Med. Microbiol.* 2007. V. 297. № 2. P. 65–81.
82. Hsu Y.H., Chung M.W., Li T.K. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 10. P. 3128–3138.
83. Condemine G., Smith C.L. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 24. P. 7389–7396.
84. Postow L., Hardy C.D., Arsuaga J., Cozzarelli N.R. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 7. P. 1766–1779.
85. Pato M.L., Karlok M., Wall C., Higgins N.P. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 20. P. 5937–5942.
86. Saha R.P., Lou Z., Meng L., Harshey R.M. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 11. P. 1–17.
87. Sawitzke J.A., Austin S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 4. P. 1671–1676.
88. Le T.B., Imakaev M.V., Mirny L.A., Laub M.T. // *Science.* 2014. V. 342. № 6159. P. 731–734.
89. Crisona N.J., Strick T.R., Bensimon D., Croquette V., Cozzarelli N.R. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 22. P. 2881–2892.
90. Peng H., Marians K.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 18. P. 8571–8575.
91. Ullsperger C., Cozzarelli N.R. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 49. P. 31549–31555.
92. Hiasa H., DiGate R.J., Marians K.J. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 3. P. 2093–2099.
93. Seol Y., Hardin A.H., Strub M.P., Charvin G., Neuman K.C. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 8. P. 4640–4649.
94. Blanche F., Cameron B., Bernard F.X., Maton L., Manse B., Ferrero L., Ratet N., Lecoq C., Goniot A., Bisch D., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. V. 40. № 12. P. 2714–2720.
95. Deibler R., Rahmati S., Zechiedrich E.L. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 748–761.
96. Kampranis S.C., Maxwell A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 25. P. 14416–14421.
97. Hsieh T.J., Farh L., Huang W.M., Chan N.L. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 53. P. 55587–55593.
98. Kato J., Nishimura Y., Imamura R., Niki H., Hiraga S., Suzuki H., Grainge I., Bregu M., Vazquez M., Sivanathan V., et al. // *EMBO J.* 1990. V. 26. № 2. P. 4228–4238.
99. Grainge I., Bregu M., Vazquez M., Sivanathan V., Ip S.C.Y., Sherratt D.J. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 19. P. 4228–4238.
100. Wang X., Reyes-Lamothe R., Sherratt D.J. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 17. P. 2426–2433.
101. Wang S.C., Shapiro L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 25. P. 9251–9256.
102. Zechiedrich E.L., Khodursky A.B., Cozzarelli N.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. № 19. P. 2580–2592.
103. Cui T., Moro-oka N., Ohsumi K., Kodama K., Ohshima T., Ogasawara N., Mori H., Wanner B., Niki H., Horiuchi T. // *EMBO Rep.* 2007. V. 8. № 2. P. 181–187.
104. Manjunatha U.H., Dalal M., Chatterji M., Radha D.R., Visweswariah S.S., Nagaraja V. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 10. P. 2144–2153.
105. Debowski A.W., Carnoy C., Verbrugghe P., Nilsson H.O., Gauntlett J.C., Fulurija A., Camilleri T., Berg D.E., Marshall B.J., Benghezal M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. 1–15.
106. Khodursky A.B., Peter B.J., Schmid M.B., DeRisi J., Botstein D., Brown P.O., Cozzarelli N.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 17. P. 9419–9424.
107. El Sayyed H., Le Chat L., Lebailly E., Vickridge E., Pages C., Cornet F., Cosentino Lagomarsino M., Espéli O. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 5. P. 1–22.
108. Brochu J., Vlachos-Breton E., Sutherland S., Martel M., Drolet M. // *PLoS Genet.* 2018. № 9. P. 1–25.
109. Kang S., Han J.S., Park J.H., Skarstad K., Hwang D.S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 49. P. 48779–48785.
110. Joshi M.C., Magnan D., Montminy T.P., Lies M., Stepankiw N., Bates D. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 8. P. 1–13.
111. Li Y., Stewart N.K., Berger A.J., Vos S., Schoeffler A.J., Berger J.M., Chait B.T., Oakley M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 44. P. 18832–18837.
112. Hayama R., Marians K.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 44. P. 18826–18831.
113. Espeli O., Lee C., Marians K.J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44639–44644.
114. Hojgaard A., Szerlong H., Tabor C., Kuempel P. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. № 5. P. 1027–1036.
115. Narayanan S., Janakiraman B., Kumar L., Radhakrishnan S.K. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 11. P. 1175–1187.
116. Zawadzki P., Stracy M., Ginda K., Zawadzka K., Lesterlin C., Kapanidis A.N., Sherratt D.J. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 11. P. 2587–2596.
117. Badrinarayanan A., Reyes-Lamothe R., Uphoff S., Leake M.C., Sherratt D.J. // *Science.* 2012. V. 338. № 6106. P. 528–531.
118. Badrinarayanan A., Lesterlin C., Reyes-Lamothe R., Sherratt D. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 17. P. 4669–4676.
119. Nicolas E., Upton A.L., Uphoff S., Henry O., Badrinarayanan A., Sherratt D. // *mBio.* 2014. V. 5. № 1. P. 1–10.
120. Jain P., Nagaraja V. // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 58. № 5. P. 1392–1405.
121. Rudolph M.G., Del Toro Duany Y., Jungblut S.P., Ganguly A., Klostermeier D. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 2. P. 1058–1070.
122. Panas M.W., Jain P., Yang H., Mitra S., Biswas D., Wattam A.R., Letvin N.L., Jacobs W.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 37. P. 13264–13271.
123. Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G., Sorek R. // *Science.* 2018. V. 359. № 6379. P. 1–12.
124. Tadesse S., Mascarenhas J., Kösters B., Hasilik A., Graumann P.L. // *Microbiology.* 2005. V. 151. № 11. P. 3729–3737.
125. Lipscomb G.L., Hahn E.M., Crowley A.T., Adams M.W.W. // *Extremophiles.* 2017. V. 21. № 3. P. 603–608.
126. Couturier M., Gabelle D., Forterre P., Nadal M., Garnier F. // *Mol. Microbiol.* 2020. V. 113. № 2. P. 356–368.
127. Han W., Feng X., She Q. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 7. P. 1–13.
128. Bergerat A., De Massy B., Gabelle D., Varoutas P.C., Nicolas A., Forterre P. // *Nature.* 1997. V. 386. № 6623. P. 414–417.
129. Wendorff T.J., Berger J.M. // *Elife.* 2018. V. 7. P. 1–35.
130. Visone V., Vettone A., Serpe M., Valenti A., Perugini G., Rossi M., Ciaramella M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. № 9. P. 17162–17187.
131. Lopez-Garcia P., Forterre P. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. № 4. P. 766–777.
132. Sioud M., Possot O., Elie C., Sibold L., Forterre P. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 2. P. 946–953.
133. Holmes M.L., Dyll-Smith M.L. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 2. P. 642–648.
134. Yamashiro K., Yamagishi A. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 24. P. 8531–8536.
135. Nagano S., Lin T.Y., Eudala J.R., Heddle J.G. // *BMC Bioinformatics.* 2014. V. 15. № 1. P. 1–15.
136. Vrielynck N., Chambon A., Vezon D., Pereira L., Chelysheva L., De Muyt A., Mézard C., Mayer C., Grelon M. // *Science.* 2016. V. 351. № 6276. P. 939–944.
137. Robert T., Nore A., Brun C., Maffre C., Crimi B., Bourbon H.-M., de Massy B. // *Science.* 2016. V. 351. № 6276. P. 943–949.
138. Hartung F., Puchta H. // *Gene.* 2001. V. 271. № 1. P. 81–86.
139. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. // *Chem. Biol.* 2010. V. 17. № 5. P. 421–433.

140. Pommier Y., Sun Y., Huang S.Y.N., Nitiss J.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 17. № 11. P. 703–721.
141. Pommier Y. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 1. P. 82–95.
142. Deweese J.E., Osheroff N. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 3. P. 738–748.
143. Atkin N.D., Raimer H.M., Wang Y.H. // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 10. P. 791–813.
144. Walker J.V., Nitiss J.L. // *Cancer Invest.* 2002. V. 20. № 4. P. 570–589.
145. Bailly C. // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. № 7. P. 3611–3640.
146. Holden J.A. // *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*. 2001. V. 1. № 1. P. 1–25.
147. Kaufmann S.H. // *Biochim. Biophys. Acta–Gene Struct. Expr.* 1998. V. 1400. № 1–3. P. 195–211.
148. Baguley B.C., Ferguson L.R. // *Biochim. Biophys. Acta–Gene Struct. Expr.* 1998. V. 1400. № 1–3. P. 213–222.
149. Wilstermann A., Osheroff N. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2005. V. 3. № 3. P. 321–338.
150. Ketron A.C., Osheroff N. // *Phytochem. Rev.* 2014. V. 13. № 1. P. 19–35.
151. Baldwin E.L., Osheroff N. // *Curr. Med. Chem.–Anti-Cancer Agents*. 2005. V. 5. № 4. P. 363–372.
152. Nitiss J.L. // *Nat. Rev. Cancer*. 2009. V. 9. № 5. P. 338–350.
153. Milyavsky M., Gan O.I., Trottier M., Komosa M., Tabach O., Notta F., Lechman E., Hermans K.G., Eppert K., Konovalova Z., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 2. P. 186–197.
154. Bracker T.U., Giebel B., Spanholtz J., Sorg U.R., Klein-Hitpass L., Moritz T., Thomale J. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. № 3. P. 722–730.
155. Ashour M.E., Atteya R., El-Khamisy S.F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2015. V. 15. № 3. P. 137–151.
156. Álvarez-Quilón A., Terrón-Bautista J., Delgado-Sainz I., Serrano-Benítez A., Romero-Granados R., Martínez-García P.M., Jimeno-González S., Bernal-Lozano C., Quintero C., García-Quintanilla L., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–14.
157. Felix C.A. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Struct. Expr.* 1998. V. 1400. № 1–3. P. 233–255.
158. Morton L.M., Dore G.M., Tucker M.A., Kim C.J., Onel K., Gilbert E.S., Fraumeni J.F., Curtis R.E. // *Blood*. 2013. V. 121. № 15. P. 2996–3004.
159. Azarova A.M., Lyu Y.L., Lin C.P., Tsai Y.C., Lau J.Y.N., Wang J.C., Liu L.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 26. P. 11014–11019.
160. Cowell I.G., Sondka Z., Smith K., Lee K.C., Manville C.M., Sidorczuk-Lesthuruge M., Rance H.A., Padget K., Jackson G.H., Adachi N., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 23. P. 8989–8994.
161. Zhang S., Liu X., Bawa-Khalife T., Lu L.S., Lyu Y.L., Liu L.F., Yeh E.T.H. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 11. P. 1639–1642.
162. Willmore E., Frank A.J., Padget K., Tilby M.J., Austin C.A. // *Mol. Pharmacol.* 1998. V. 54. № 1. P. 78–85.
163. Willmore E., Errington F., Tilby M.J., Austin C.A. // *Biochem. Pharmacol.* 2002. V. 63. № 10. P. 1807–1815.
164. Larsen A.K., Escargueil A.E., Skladanowski A. // *Pharmacol. Ther.* 2003. V. 99. № 2. P. 167–181.
165. Henriksen P.A. // *Heart*. 2018. V. 104. № 12. P. 971–977.
166. Marinello J., Delcuratolo M., Capranico G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 11. P. 3480–3498.
167. Deng S., Yan T., Jendry C., Nemecek A., Vincetic M., Gödtel-Armbrust U., Wojnowski L. // *BMC Cancer*. 2014. V. 14. № 1. P. 1–11.
168. Vavrova A., Jansova H., Mackova E., Machacek M., Haskova P., Tichotova L., Sterba M., Simunek T. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 10. P. 1–13.
169. McClendon A.K., Rodriguez A.C., Osheroff N. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 47. P. 39337–39345.
170. Uemura T., Ohkura H., Adachi Y., Morino K., Shiozaki K., Yanagida M. // *Cell*. 1987. V. 50. № 6. P. 917–925.
171. Swanston A., Zabrady K., Ferreira H.C. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 12. P. 6172–6183.
172. Kawano S., Kato Y., Okada N., Sano K., Tsutsui K., Tsutsui K.M., Ikeda S. // *J. Biochem.* 2015. V. 159. № 3. P. 363–369.
173. Ladouceur A.M., Ranjan R., Smith L., Fadero T., Heppert J., Goldstein B., Maddox A.S., Maddox P.S. // *J. Cell Biol.* 2017. V. 216. № 9. P. 2645–2655.
174. Mengoli V., Bucciarelli E., Lattao R., Piergentili R., Gatti M., Bonaccorsi S. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 10. P. 15–17.
175. Samejima K., Samejima I., Vagnarelli P., Ogawa H., Vargiu G., Kelly D.A., Alves F. de L., Kerr A., Green L.C., Hudson D.F., et al. // *J. Cell Biol.* 2012. V. 199. № 5. P. 755–770.
176. Gonzalez R.E., Lim C.U., Cole K., Bianchini C.H., Schools G.P., Davis B.E., Wada I., Roninson I.B., Broude E.V. // *Cell Cycle*. 2011. V. 10. № 20. P. 3505–3514.
177. Dovey M., Patton E.E., Bowman T., North T., Goessling W., Zhou Y., Zon L.I. // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. № 13. P. 3746–3753.
178. Yang X., Li W., Prescott E.D., Burden S.J., Wang J.C. // *Science*. 2000. V. 287. № 5450. P. 131–134.
179. Lyu Y.L., Lin C.-P., Azarova A.M., Cai L., Wang J.C., Liu L.F. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26. № 21. P. 7929–7941.
180. Petrova B., Dehler S., Kruitwagen T., Heriche J.-K., Miura K., Haering C.H. // *Mol. Cell Biol.* 2013. V. 33. № 5. P. 984–998.
181. Zhang H., Zhang Y.W., Yasukawa T., Dalla Rosa I., Khiati S., Pommier Y. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 11. P. 7259–7267.
182. Woessner R.D., Mattern M.R., Mirabelli C.K., Johnson R.K., Drake F.H. // *Cell Growth Differ.* 1991. V. 2. № 4. P. 209–214.
183. Singh B.N., Mudgil Y., Sopory S.K., Reddy M.K. // *Plant Mol. Biol.* 2003. V. 52. № 5. P. 1063–1076.
184. Turlley H., Comley M., Houlbrook S., Nozaki N., Kikuchi A., Hickson I.D., Gatter K., Harris A.L. // *Br. J. Cancer*. 1997. V. 75. № 9. P. 1340–1346.
185. Austin C.A., Marsh K.L. // *BioEssays*. 1998. V. 20. № 3. P. 215–226.
186. Linka R.M., Porter A.C.G., Volkov A., Mielke C., Boege F., Christensen M.O. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 11. P. 3810–3822.
187. Meczes E.L., Gilroy K.L., West K.L., Austin C.A. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 3. P. 1–7.
188. Gilroy K.L., Austin C.A. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 2. P. 1–7.
189. Kouzine F., Gupta A., Baranello L., Wojtowicz D., Ben-Aissa K., Liu J., Przytycka T.M., Levens D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 3. P. 396–403.
190. Joshi R.S., Piña B., Roca J. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 16. P. 7907–7915.
191. Canela A., Maman Y., Huang S. yin N., Wutz G., Tang W., Zagnoli-Vieira G., Callen E., Wong N., Day A., Peters J.M., et al. // *Mol. Cell*. 2019. V. 75. № 2. P. 252–266.e8.
192. King I.F., Yandava C.N., Mabb A.M., Hsiao J.S., Huang H.S., Pearson B.L., Calabrese J.M., Starmer J., Parker J.S., Magnuson T., et al. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7465. P. 58–62.
193. Yu X., Davenport J.W., Urtishak K.A., Carillo M.L., Gosai S.J., Kolaris C.P., Byl J.A.W., Rappaport E.F., Osheroff N., Gregory B.D., et al. // *Genome Res.* 2017. V. 27. № 7. P. 1238–1249.
194. Durand-Dubief M., Persson J., Norman U., Hartsuiker E., Ekwall K. // *EMBO J.* 2010. V. 29. № 13. P. 2126–2134.
195. Sperling A.S., Jeong K.S., Kitada T., Grunstein M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 31. P. 12693–12698.
196. Pedersen J.M., Fredsoe J., Roedgaard M., Andreasen L., Mundbjerg K., Kruhoffer M., Brinch M., Schierup M.H., Bjergbaek L., Andersen A.H. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 12. P. 1–15.

197. Ju B.G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. // *Science*. 2006. V. 312. № 5781. P. 1798–1802.
198. Williamson L.M., Lees-Miller S.P. // *Carcinogenesis*. 2011. V. 32. № 3. P. 279–285.
199. Haffner M.C., Aryee M.J., Toubaji A., Esopi D.M., Albadine R., Gurel B., Isaacs W.B., Bova G.S., Liu W., Xu J., et al. // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 8. P. 668–675.
200. Trotter K.W., King H.A., Archer T.K. // *Mol. Cell. Biol.* 2015. V. 35. № 16. P. 2799–2817.
201. Madabhushi R., Gao F., Pfenning A.R., Pan L., Yamakawa S., Seo J., Rueda R., Phan T.X., Yamakawa H., Pao P.C., et al. // *Cell*. 2015. V. 161. № 7. P. 1592–1605.
202. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Liu J.S., Ren B. // *Nature*. 2012. V. 485. № 7398. P. 376–380.
203. Sati S., Cavalli G. // *Chromosoma*. 2017. V. 126. № 1. P. 33–44.
204. 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. № 5950. P. 289–293.
205. Rao S.S.P., 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. № 7. P. 1665–1680.
206. Merckenschlager M., Nora E.P. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2016. V. 17. № 1. P. 17–43.
207. Uusküla-Reimand L., Hou H., Samavarchi-Tehrani P., Rudan M.V., Liang M., Medina-Rivera A., Mohammed H., Schmidt D., Schwalie P., Young E.J., et al. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 1–22.
208. Canela A., Sridharan S., Sciascia N., Tubbs A., Meltzer P., Sleckman B.P., Nussenzweig A. // *Mol. Cell*. 2016. V. 63. № 5. P. 898–911.
209. Gothe H.J., Bouwman B.A.M., Gusmao E.G., Piccinno R., Petrosino G., Sayols S., Drechsel O., Minneker V., Josipovic N., Mizi A., et al. // *Mol. Cell*. 2019. V. 75. № 2. P. 267–283.
210. Canela A., Maman Y., Jung S., Wong N., Callen E., Day A., Kieffer-Kwon K.R., Pekowska A., Zhang H., Rao S.S.P., et al. // *Cell*. 2017. V. 170. № 3. P. 507–521.e18.
211. Gittens W.H., Johnson D.J., Allison R.M., Cooper T.J., Thomas H., Neale M.J. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1–16.
212. Sanborn A.L., Rao S.S.P., 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–E6465.
213. Racko D., Benedetti F., Goundaroulis D., Stasiak A. // *Polymers (Basel)*. 2018. V. 10. № 10. P. 1–11.
214. Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L.A. // *Cell Rep*. 2016. V. 15. № 9. P. 2038–2049.
215. Benedetti F., Dorier J., Stasiak A. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 16. P. 10425–10432.
216. Havugimana P.C., Hart G.T., Nepusz T., Yang H., Turinsky A.L., Li Z., Wang P.I., Boutz D.R., Fong V., Phanse S., et al. // *Cell*. 2012. V. 150. № 5. P. 1068–1081.
217. Varga-Weisz P.D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P.B. // *Nature*. 1997. V. 388. № 6642. P. 598–602.
218. LeRoy G., Loyola A., Lane W.S., Reinberg D. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 20. P. 14787–14790.
219. Ho L., Crabtree G.R. // *Nature*. 2010. V. 463. № 7280. P. 474–484.
220. Wang W., Xue Y., Zhou S., Kuo A., Cairns B.R., Crabtree G.R. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 17. P. 2117–2130.
221. Hota S.K., Bruneau B.G. // *Dev.* 2016. V. 143. № 16. P. 2882–2897.
222. Dykhuizen E.C., Hargreaves D.C., Miller E.L., Cui K., Korshunov A., Kool M., Pfister S., Cho Y.J., Zhao K., Crabtree G.R. // *Nature*. 2013. V. 497. № 7451. P. 624–627.
223. Rasim Barutcu A., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., Imbalzano A.N. // *Nucleus*. 2017. V. 8. № 2. P. 150–155.
224. Thompson R.J., Mosig G. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. № 3. P. 873–891.
225. Wall M.K., Mitchenall L.A., Maxwell A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 20. P. 7821–7826.
226. Tang Girdwood S.C., Nenortasa E., Shapiro T.A. // *Physiol. Behav.* 2017. V. 176. № 12. P. 139–148.
227. Cho H.S., Lee S.S., Kim K.D., Hwang I., Lim J.-S., Park Y.-I., Pai H.-S. // *Plant Cell*. 2004. V. 16. № 10. P. 2665–2682.
228. Evans-Roberts K.M., Breuer C., Wall M.K., Sugimoto-Shirasu K., Maxwell A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 3. P. 1–7.
229. Evans-Roberts K.M., Mitchenall L.A., Wall M.K., Leroux J., Mylne J.S., Maxwell A. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 291. № 7. P. jbc.M115.689554.
230. Reddy M.K., Achary V.M.M., Singh B.N., Manna M., Sheri V., Panditi V., James D., Fartyal D., Ram B., Kaul T. // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 28. № 3. P. 291–300.
231. Heinhorst S., Cannon G., Weissbach A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. V. 239. № 2. P. 475–479.
232. Boyer L.A., Latek R.R., Peterson C.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 2. P. 158–163.
233. Yang Z., Hou Q., Cheng L., Xu W., Hong Y., Li S., Sun Q. // *Plant Cell*. 2017. V. 29. № 10. P. 2478–2497.
234. Jain M., Tyagi A.K., Khurana J.P. // *FEBS J.* 2006. V. 273. № 23. P. 5245–5260.
235. An X.J., Deng Z.Y., Wang T. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 5. P. 1–14.
236. Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R., Stacey N.J., McCann M.C., Maxwell A., Roberts K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 51. P. 18736–18741.
237. Sugimoto-Shirasu K., Stacey N.J., Corsar J., Roberts K., McCann M.C. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 20. P. 1782–1786.
238. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 3. P. 589–600.
239. Yu H., Wang M., Tang D., Wang K., Chen F., Gong Z., Gu M., Cheng Z. // *Chromosoma*. 2010. V. 119. № 6. P. 625–636.
240. Mittal A., Balasubramanian R., Cao J., Singh P., Subramanian S., Hicks G., Nothnagel E.A., Abidi N., Janda J., Galbraith D.W., et al. // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. № 15. P. 4217–4239.
241. Tian Y., Gu H., Fan Z., Shi G., Yuan J., Wei F., Yang Y., Tian B., Cao G., Huang J. // *Planta*. 2019. V. 249. № 4. P. 1119–1132.
242. Kirik V., Schrader A., Uhrig J.F., Hulskamp M. // *Plant Cell*. 2007. V. 19. № 10. P. 3100–3110.
243. Breuer C., Stacey N.J., West C.E., Zhao Y., Chory J., Tsukaya H., Azumi Y., Maxwell A., Roberts K., Sugimoto-Shirasu K. // *Plant Cell*. 2007. V. 19. № 11. P. 3655–3668.
244. Šimková K., Moreau F., Pawlak P., Vriet C., Baruah A., Alexandre C., Hennig L., Apel K., Laloï C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 40. P. 16360–16365.
245. Kreuzer K.N., Jongeneel C.V. // *Methods Enzymol.* 1983. V. 100. № 1980. P. 557–580.
246. Kreuzer K.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1400. № 1–3. P. 339–347.
247. Nossal N.G., Dudas K.C., Kreuzer K.N. // *Mol. Cell*. 2001. V. 7. № 1. P. 31–41.
248. Hong G., Kreuzer K.N. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 2. P. 594–603.
249. Lavysh D., Sokolova M., Minakhin L., Yakunina M., Artamonova T., Kozyavkin S., Makarova K.S., Koonin E.V., Severinov K. // *Virology*. 2016. V. 495. P. 185–196.
250. Gadelle D., Krupovic M., Raymann K., Mayer C., Forterre P. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 13. P. 8578–8591.
251. Takahashi T.S., Da Cunha V., Krupovic M., Mayer C., Forterre P., Gadelle D. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 2. № 1. P. 1–13.

УДК 571.27

Белки семейства Snail: роль в канцерогенезе и перспективы противоопухолевой терапии

М. А. Ястребова^{1*}, А. И. Хамидуллина¹, В. В. Татарский^{1,2}, А. М. Щербаков²

¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

*E-mail: ritayastrebova2009@gmail.com

Поступила в редакцию 29.06.2020

Принята к печати 04.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11062

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены белки семейства Snail – транскрипционные факторы, регулирующие эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Описана структура белков Snail, посттрансляционные модификации и механизмы Snail-зависимой регуляции генов. Проанализирована роль белков семейства Snail в канцерогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. Детально охарактеризованы сигнальные механизмы, опосредующие прохождение ЭМП, в которых участвуют белки семейства Snail. Рассмотрены изменения Snail-зависимых сигналов при снижении парциального давления кислорода в опухоли (гипоксии) – условия, отягощающем течение заболевания. Описаны химические соединения, блокирующие транскрипционную активность Snail. Важная роль Snail в биологии опухолей и возможность фармакологического ингибирования белков этого семейства позволяют считать их перспективными мишенями для противоопухолевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транскрипционные факторы, Snail, Slug, эпителиально-мезенхимальный переход, мезенхимально-эпителиальный переход, рак молочной железы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВКМ – внеклеточный матрикс; ММП – матриксные металлопротеиназы; МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход; ОСК – опухолевые стволовые клетки; РМЖ – рак молочной железы; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе метастазирования опухолевые клетки приобретают локомоторный фенотип и появляются в сосудистом русле [1, 2]. Процесс, в результате которого высокодифференцированные поляризованные эпителиальные клетки приобретают локомоторный фенотип мезенхимальных клеток, называется эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) [3]. В регуляции этого процесса ключевую роль играют белки семейства Snail – транскрипционные факторы, контролирующие экспрессию генов, продукты которых реализуют фенотип/фенотипы ЭМП и, в итоге, прогрессию новообразований [4]. За последние 15 лет созданы противоопухолевые средства нового поколения. Терапия опухолей становится мишень-направленной и ориентированной на отдельные механизмы регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток. В практику вошли ингибиторы протеинкиназ, модуляторы баланса «выжи-

вание-гибель», ингибиторы протеасом и др. – эти средства позволяют получить значимые терапевтические эффекты в отдельных группах больных [5–8]. Наряду с «классическими» схемами химиотерапии испытываются персонализированные подходы, учитывающие биологические характеристики конкретного новообразования. Такие подходы особенно важны при разработке оптимальных схем терапии больных с метастатическими опухолями.

Несмотря на прогресс в понимании механизмов метастазирования, эффективные антиметастатические препараты по-прежнему отсутствуют, поэтому актуальным остается изучение молекул, снижающих метастатический потенциал опухоли.

В обзоре обсуждаются сигнальные пути белков семейства Snail, их роль в поддержании агрессивного поведения опухолевой клетки, а также перспективы фармакологического воздействия на ЭМП для решения клинических вопросов.

МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ И ЭМП

За время, прошедшее после первого описания феномена ЭМП [3], были выяснены его основные механизмы. К основным критериям ЭМП относятся изменение экспрессии генов-маркеров эпителиальных и мезенхимальных клеток, а также морфологии клеток и увеличение их миграционной способности. Цитокины, факторы роста, молекулы внеклеточного матрикса (ВКМ) активируют сигнальные пути, запускающие программу ЭМП. Эти пути реализуются посредством ряда транскрипционных факторов (Slug, Snail, ZEB1/2, Twist1/2 и др.), связывающихся с регуляторными областями генов-мишеней. Регуляция ЭМП продуктами этих генов приводит к ингибированию эпителиальных маркеров (Е-кадгерин, клаудины, окклюдин и др.) и активации мезенхимальных (виментин, фибронектин, N-кадгерин и др.). Мезенхимальные клетки обладают повышенной подвижностью, инвазивностью, устойчивостью к апоптозу, в них увеличена продукция компонентов ВКМ [9, 10].

После приобретения мезенхимального фенотипа опухолевые клетки могут мигрировать из эпителиального пласта по кровеносному руслу, а достигая метастатической ниши путем мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), возвращаются к исходному фенотипу, что ведет к образованию метастазов. Изучены некоторые механизмы, регулирующие МЭП, включая динамическую регуляцию факторов, индуцирующих ЭМП во время метастатического каскада. Постепенное снижение экспрессии Snail в опухолевых клетках в процессе колонизации, обусловленное ингибированием с помощью микроРНК, приводит к индукции МЭП. В частности, miR-34 и miR-200 подавляют транскрипционные факторы Snail и ZEB1/2 [11–13]. Однако не до конца ясно, является ли МЭП активно регулируемым процессом, запускаемым определенными сигнальными молекулами, или же происходит пассивно при отсутствии факторов, стимулирующих и поддерживающих ЭМП в метастатическом очаге, по сравнению с первичной опухолью.

ЭМП встречается при многих процессах в эмбриональном (формирование мезодермы, миграция клеток нервного гребня, определение лево-правой асимметрии, а также образование париетальной энтодермы) и постнатальном развитии [14, 15]. В патологических условиях ЭМП сопровождает злокачественную трансформацию и прогрессию опухолей, а также развитие фиброза. Белки Snail и Slug исследованы в качестве регуляторов ЭМП при прогрессии опухолей, где они участвуют в регуляции выживания и пролиферации клеток, инвазии и формировании метастазов [16–18], а также регулируют энергетиче-

ский метаболизм и поддерживают резистентность к терапии [19].

Новая классификация ЭМП включает четыре стадии: эпителиальную, раннюю гибридную, позднюю гибридную и мезенхимальную. Показано, что активность Snail возрастает, начиная с ранней гибридной стадии, тогда как изменения формы клеток от округлой к вытянутой наступают только на поздней гибридной стадии. Эти изменения сопровождаются постепенной утратой межклеточной адгезии [20].

СТРУКТУРА БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Snail

Белки семейства Snail – Snail/SNAI1 и Slug/SNAI2 – являются репрессорами транскрипции [21]. Эти белки имеют высококонсервативную С-концевую область, включающую четыре (Snail) и пять (Slug) «цинковых пальцев», которая участвует в связывании белков с промоторами генов-мишеней, содержащими последовательность E-box. N-Концевые участки содержат эволюционно консервативный домен SNAG, необходимый для репрессии транскрипции; к нему могут присоединяться метилтрансферазы и деацетилазы гистонов [4]. Несмотря на сходство N- и С-концевых областей Snail и Slug, центральные обогащенные пролином области, опосредующие убиквитинирование и протеолитическую деградацию этих белков, различаются. Snail содержит область для деградации белка (DB) и последовательность (сигнал) ядерного экспорта NES, а Slug несет специфическую последовательность SLUG. Домены SNAG и SLUG белка Slug необходимы для репрессии промотора гена E-кадгерина. Домен SLUG взаимодействует с корепрессором CtBP1, а домен SNAG с корепрессором NCoR [22]. Интересно, что домен SNAG необходим для индукции ЭМП, в то время как домен SLUG, возможно, осуществляет негативную регуляцию Slug-опосредованного ЭМП [23] (рис. 1).

Функциональная активность белков определяется их структурой, конфигурацией и посттрансляционными модификациями [24].

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Snail

Snail – лабильный белок, время полужизни которого не превышает 4 ч [25]. Как и многие белки, Snail подвергается различным посттрансляционным модификациям, влияющим на его стабильность, внутриклеточную локализацию и транскрипционную активность. Выявлены два сайта фосфорилирования Snail – один определяет его протеолиз в протеасоме, другой – внутриклеточную локализацию. Протеинкиназа GSK-3 β (киназа гликогенсинтазы-3 β) связывается со Snail и фосфорилирует его, что приводит к экспорту белка из ядра в цитоплазму.

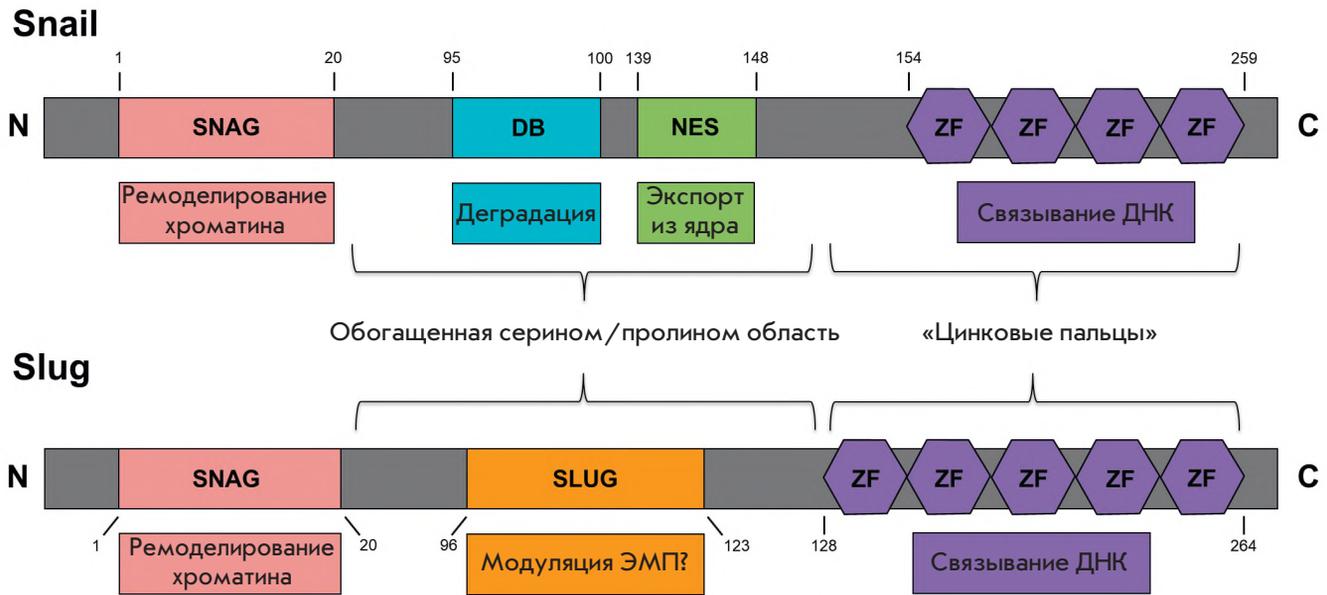


Рис. 1. Структура белков Snail и Slug

Последующее фосфорилирование посредством GSK-3 β уже в цитоплазме обеспечивает связывание Snail с E3-убиквитинлигазой β -TrCP и деградацию Snail в протеасоме [26]. С убиквитинлигазой FBXL14 могут связываться как фосфорилированные, так и нефосфорилированные формы Snail, что также приводит к его протеасомной деградации. Показано, что деубиквитиназа DUB3 способна «уберегать» Snail от деградации в протеасоме, тем самым стабилизируя его [27]. Для стабилизации Snail в ядре также необходима протеинкиназа PAK1, обеспечивающая его фосфорилирование по остатку серина в положении 246. В свою очередь, протеинкиназа A (PKA) фосфорилирует Snail по остаткам серина в положениях 11 и 92, усиливая его трансактивацию [28].

Стабильность транскрипционного фактора Slug регулируется схожим образом и зависит от фосфорилирования протеинкиназой GSK-3 β . Идентифицированы сайты фосфорилирования Slug (Ser-4 и 88). Для индукции ЭМП посредством Slug необходимо фосфорилирование серина-4 [23].

Кроме фосфорилирования протеинкиназами, в стабилизации Snail/Slug участвуют ацетилтрансферазы гистонов (НАТ), которые обеспечивают их ядерную локализацию и взаимодействие с коактиваторами [29]. E3-убиквитинлигаза A20 моноубиквитинирует Snail по трем остаткам лизина, что снижает его аффинность к GSK-3 β и поддерживает ядерную локализацию, облегчая ЭМП клеток рака молочной железы (РМЖ), индуцированный трансформирующим фактором роста β (TGF- β 1). Нокдаун A20 или повышенная экспрессия Snail с заменой

моноубиквитинированных остатков лизина на аргинин предотвращает развитие метастазов в моделях РМЖ [30].

МИШЕНИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА Snail

Между белками Slug и Snail, несмотря на значительную (~ 70%) гомологию их аминокислотных последовательностей, имеются важные функциональные различия. Например, активность Snail необходима в раннем эмбриогенезе, так как эмбрионы мышей с нокаутом гена *snail* погибают на стадии гаструляции: у них нарушается образование слоя мезодермы, в котором клетки сохраняют эпителиальные признаки – полярность, плотные межклеточные контакты и экспрессию E-кадгерина [31]. Мыши с нокаутом *snai2* жизнеспособны, но у них нарушено образование клеток нервного гребня и формирование мезодермы [32]. Как Snail, так и Slug, необходимы для формирования костной ткани, хондрогенеза [33] и сомитогенеза [34].

Snail и Slug необходимы для регенерации тканей взрослого организма, в частности, для заживления ран [15]. Ключевую роль здесь играет именно Slug, который находится под контролем фактора роста эпидермиса (EGF), секретируемого при заживлении [35]. У мышей с нокаутом *snai2* отсутствует миграция кератиноцитов в рану при сохранении маркеров пролиферации K6 и Ki-67 и высоких уровнях E-кадгерина и K8 [36].

На модели колоректального рака человека с помощью ChIPseq показано, что транскрипционный

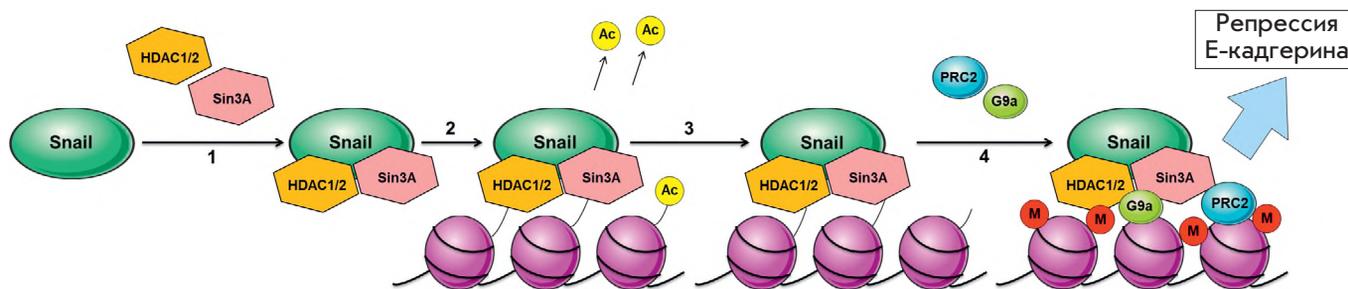


Рис. 2. Snail-опосредованная репрессия E-кадгерина. 1 – образование репрессорного комплекса (Snail, деацетилаза, Sin3A); 2 – деацетилирование гистонов H3 и H4; 3 – присоединение ингибирующего комплекса PRC2 и метилтрансферазы G9a; 4 – гиперметилирование ДНК. Адаптировано из [42]

фактор Snail в основном связывается с областями, расположенными выше сайта старта транскрипции (в пределах 1 т.п.н.), а также в межгенных участках и интронах, дистальных по отношению к промотору. Таким образом, Snail контролирует транскрипцию в большей степени, связываясь с отдаленными регуляторными элементами ДНК [37]. Оказалось, что Snail преимущественно связывается с генами, ответственными за дифференцировку, морфогенез, органогенез, передачу сигнала и клеточные контакты, что хорошо согласуется с его известными биологическими функциями [37]. В клетках трижды негативного РМЖ идентифицированы два дополнительных сайта связывания Snail: мотивы TAL / GATA1 и TGG RREB1 / RUNX2 / PAX4, что обеспечивает более специфичное узнавание генов-мишеней по сравнению с другими факторами транскрипции [38].

Snail и Slug могут действовать и как транскрипционные репрессоры и служить активаторами транскрипции генов, кодирующих мезенхимальные белки – N-кадгерин, виментин, фибронектин и др. [39, 40]. Snail может также индуцировать транскрипцию путем взаимодействия с транскрипционными факторами EGR1 и SP1 [41].

Snail-опосредованный механизм репрессии экспрессии генов детально изучен на примере E-кадгерина – маркера эпителиальных клеток (рис. 2).

Домен SNAG белка Snail взаимодействует с гистондеацетилазами HDAC1 и 2, а также с белком Sin3A. Образовавшийся комплекс связывается с областью E-box в промоторе гена E-кадгерина – *CDH1*, что приводит к деацетилированию гистонов H3 и H4. Эта модификация облегчает присоединение ингибиторного комплекса PRC2 и гистон-метилтрансферазы G9a: второй акт ингибирования экспрессии E-кадгерина происходит путем гиперметилирования ДНК. После первоначального подавления E-кадгерина Snail индуциру-

ет экспрессию транскрипционного фактора ZEB1, что приводит к дальнейшему торможению экспрессии E-кадгерина, но уже посредством PRC2-независимого механизма, детали которого пока неизвестны [42].

Snail/Slug-зависимая транскрипция приводит не только к репрессии E-кадгерина, но и к разрывке десмосом и плотных межклеточных контактов вследствие репрессии генов окклюдина, клаудинов типа 3, 4, 7 и десмоплакинов [43, 44]. Snail и Slug также увеличивают синтез матриксных металлопротеиназ (ММП), способствуя тем самым деградации компонентов ВКМ [45, 46].

Изменение подвижности клеток при ЭМП и образование локомоторного фенотипа связаны с активностью белков Rho-семейства – малых GTP-аз Rac1, RhoA, RhoV и Cdc42, контролирующей динамику актина [47]. Rac1 регулирует TGF- β -зависимую активацию Snail: нокдаун Rac1 приводит к снижению активности Snail и MMP9 [48]. Напротив, ингибирование RhoA увеличивает уровень Snail [49]. RhoV вместе со Snail индуцируют Slug при ЭМП в ходе эмбрионального развития [50]. Увеличение подвижности клеток рака поджелудочной железы с повышенным уровнем Snail зависит от Rac1 [45], а повышение уровня Slug приводит к подавлению ROCK1/2 [46]. Подавление Snail значительно снижает подвижность клеток за счет меньшей активности Cdc42 и одновременного увеличения активности RhoA [51]. Таким образом, оба белка – Snail и Slug – контролируются малыми GTP-азами, отвечающими за подвижность клеток, и сами способны регулировать их активность, позволяя координировать изменения фенотипов клеток в эмбриогенезе и при прогрессии опухолей.

Snail играет важную роль в клеточном цикле и выживании клеток. Во время эмбрионального развития Snail репрессирует транскрипцию гена циклина D2 и увеличивает экспрессию гена p21^{Cip1/WAF1} для регуляции перехода от ранней фазы G1 к поздней. Повышение экспрессии циклинзависимых киназ

CDK4/6 способствует стабилизации Snail через опосредованное DUB3 деубиквитинирование [27]. В клетках эпителия почки (линия MDCK), стабильно экспрессирующих экзогенный Snail, около 90% клеток находились в фазе G0/G1 после 72 ч культивирования. Сверхэкспрессия Snail приводит к снижению CDK4 и фосфорилирования Rb, а также к увеличению уровня p21^{Cip1/WAF1} [52]. Таким образом, с помощью Snail можно вызвать задержку или остановку продвижения клеток по клеточному циклу.

Slug также участвует в регуляции смены фаз клеточного цикла. Показано, что Slug действует в функциональной кооперации с циклином D1. Нокдаун Slug в линии клеток трижды негативного РМЖ MDA-MB-231 снижает скорость пролиферации клеток, вероятно, за счет снижения уровня циклина D1 [53]. Согласно другому исследованию, индуцированная экспрессия Slug может привести к ингибированию циклина D1 и остановке клеток рака предстательной железы в фазе G0/G1. Таким образом, в клетках разного тканевого происхождения Slug играет разную роль [54].

Snail регулирует выживание клеток при снижении концентрации сыворотки в культуральной среде, активируя сигнальные пути MAPK (Mek/Erk) и PI3K. Snail и Slug подавляют экспрессию ряда проапоптотических факторов на уровне транскрипции, таких, как: p53, BID, каспаза 6, PUMA/BBC3, ATM, DFF40 (фактор фрагментации ДНК), PTEN (фосфатаза в каскаде PI3K) [52, 55–57]. Интересно, что с опухолевым супрессором p53 белок Snail может взаимодействовать напрямую, блокируя его ДНК-связывающий домен [58].

Интересно отметить, что транскрипционные мишени Snail и Slug схожи, но сведений о взаимной регуляции этих белков недостаточно. По нашим данным, экспрессия Snail и Slug взаимозависима. Так, при сверхэкспрессии Snail в клетках линии MDA-MB-231 наблюдается резкое снижение уровня белка Slug, а при ингибировании Snail малыми интерферирующими РНК уровень Slug повышается. Возможно, Snail и Slug компенсируют друг друга в определенных условиях [59].

Активировать транскрипционные факторы семейства Snail могут различные экзогенные стимулы. Ниже приведены результаты анализа основных сигнальных путей, регулирующих Snail и Slug.

РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Snail ПРИ ЭМП

ЭМП – это динамичный процесс, который может инициироваться, например, белками ВКМ и секретруемыми растворимыми факторами роста: эпидермиса (EGF), гепатоцитов (HGF), фибробластов (FGF), морфогенетическими белками костной ткани

(BMP), TGF- β , Wnt, Notch, фактором некроза опухоли α (TNF- α), цитокинами [60, 61]. Многие из этих сигнальных молекул микроокружения опухолевых клеток индуцируют экспрессию белков семейства Snail (рис. 3).

Сигнальные каскады, инициируемые активацией рецепторных тирозинкиназ (RTK) и факторами роста, приводят к увеличению уровня Snail, а также его стабилизации и транслокации в ядро. Сигнальные каскады MAPK или PI3K участвуют в регуляции ЭМП в кооперации с TGF- β [62]. Репрессия MAPK в некоторых моделях опухолей достаточна для снижения экспрессии Snail и Slug и ингибирования ЭМП [63–65].

Многофункциональный белок TGF- β регулирует пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. На ранних стадиях канцерогенеза TGF- β выступает как супрессор опухолевого роста, а на более поздних способствует формированию злокачественного фенотипа [66]. Snail играет важную роль в регуляции ответа клеток на TGF- β , обеспечивая их устойчивость к TGF- β -опосредованному апоптозу и прогрессию опухоли. На поздних стадиях TGF- β индуцирует ЭМП, действуя SMAD-зависимым способом через Snail. Белки SMAD взаимодействуют с промотором гена *SNAIL1* и индуцируют экспрессию Snail, что приводит к репрессии E-кадгерина и инвазивному фенотипу [4]. Показано, что при TGF- β -индуцированном ЭМП Snail образует комплекс со SMAD3/4. Этот комплекс связывается с областями E-box и SMAD-связывающими элементами в промоторах генов, кодирующих белки межклеточных контактов, и репрессирует эти гены [67].

Активация сигнального пути Notch индуцирует ЭМП, опосредованный Snail/Slug, что способствует инвазии и метастазированию клеток РМЖ [68]. Notch контролирует экспрессию Snail с помощью двух синергичных механизмов: прямой активации транскрипции и непрямого воздействия через лизилоксидазу (LOX), стабилизирующую Snail. Notch рекрутирует индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) на промотор LOX, активируя этот ген [67]. Кроме того, Notch, активируемый лигандом Jagged1, стимулирует репрессор Slug и подавляет E-кадгерин, что приводит к так называемому гибриднему (промежуточному) фенотипу ЭМП. Для этого фенотипа характерны частичное увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров и снижение экспрессии эпителиальных маркеров. При этом отсутствуют значительные морфологические изменения клеток и нет полной потери межклеточных контактов [69].

Регулировать экспрессию гена *SNAIL1* также может ядерный фактор NF- κ B/p65. NF- κ B, после его

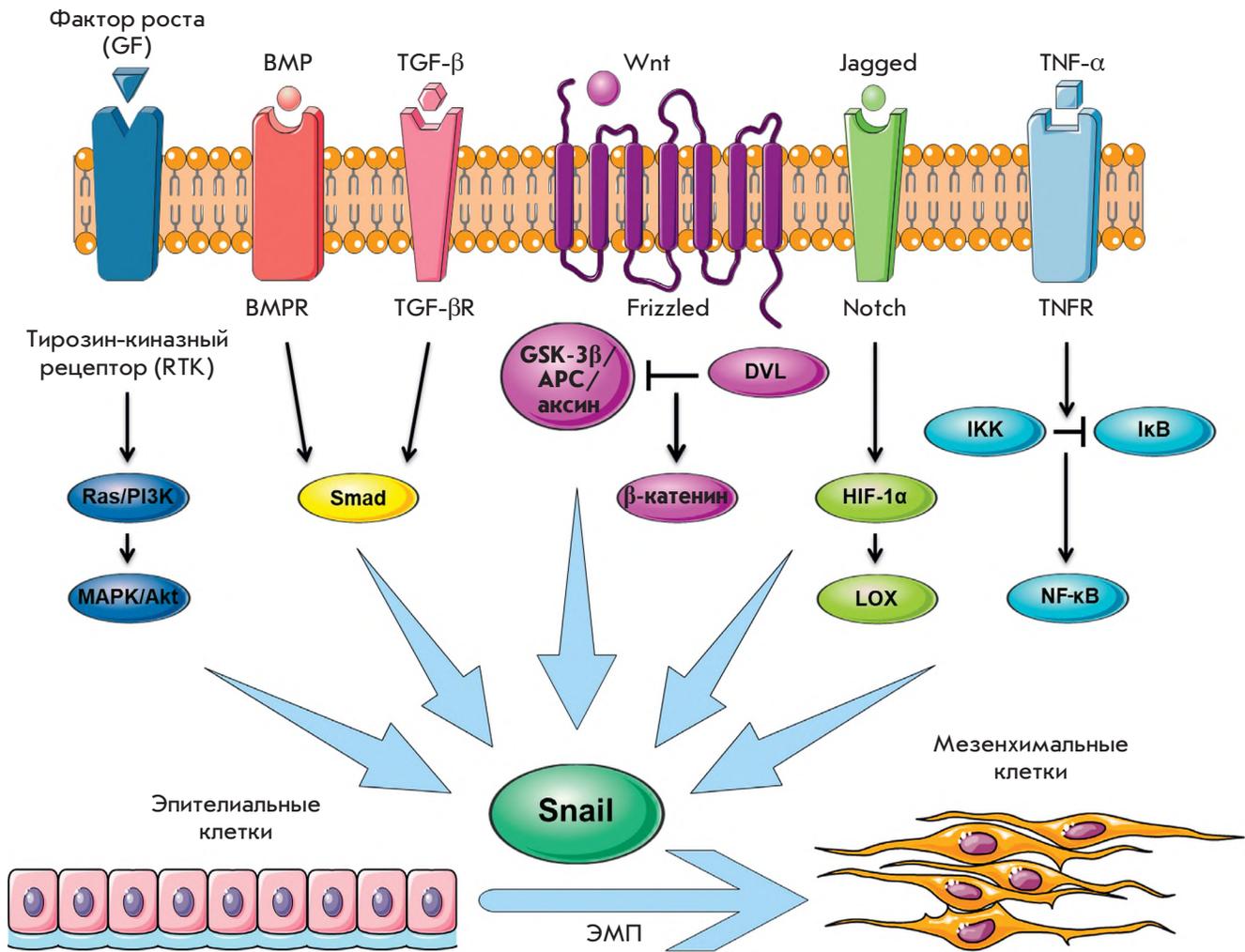


Рис. 3. Механизмы Snail-индуцированного ЭМП

активации цитокином TNF- α , связывается с промотором *SNAIL1*; активация транскрипции этого гена индуцирует ЭМП [25]. Экспрессия *SNAIL1* может увеличиваться и через сигнальный путь Akt: протеинкиназа Akt1 фосфорилирует IKK α , что приводит к протеолитической деградации ингибиторной субъединицы I κ B, высвобождению димеров NF- κ B, их транслокации в ядро и транскрипции *SNAIL1* [70]. Показано, что одновременное подавление Snail и NF- κ B повышает чувствительность клеток РМЖ к антиэстрогенам [71]. Одновременное воздействие на эти два фактора транскрипции может представлять интерес для разработки подходов к противоопухолевой терапии.

При активации сигнального пути Wnt наблюдается ингибирование фосфорилирования β -катенина и Snail посредством GSK-3 β , что приводит к накоплению β -катенина и Snail в ядре. β -катенин, действующий как фактор транскрипции во взаимодействии

с TCF/LEF, необходим для индукции ЭМП в эпителиоцитах. Синергический эффект Snail и β -катенина позволяет опухолевым клеткам выживать при инвазии и метастазировании [72].

Свою роль в ЭМП играет также белок MDM2. Повышенная экспрессия MDM2 в линии клеток MCF7 РМЖ приводит к изменению их морфологии с эпителиальной на мезенхимальную. Нокдаун MDM2 в клетках MDA-MB-231, напротив, изменяет морфологию клеток с мезенхимальной на эпителиальную (МЭП). Кроме того, повышенная экспрессия MDM2 увеличивает экспрессию N-кадгерина и виментина, а также снижает экспрессию E-кадгерина на уровне мРНК и белка. Понижение экспрессии MDM2 уменьшает экспрессию N-кадгерина и виментина и увеличивает экспрессию E-кадгерина. MDM2 увеличивает уровень как мРНК, так и белка Snail путем активации сигнального пути TGF- β -SMAD. Показано, что нокдаун *SNAIL1* в клетках, вступивших

в индуцированный MDM2 ЭМП, приводит к возвращению этих клеток к исходному эпителиальному фенотипу. Таким образом, MDM2, как и Snail, можно рассматривать в качестве терапевтической мишени при метастатическом РМЖ [73].

Важно, что ключевые транскрипционные факторы, опосредующие ЭМП, могут влиять на экспрессию друг друга. Нами показано, что нокдаун генов *TWIST1* и *ZEB1* малыми интерферирующими РНК приводит к снижению уровня белка Slug, однако обратный эффект при этом не наблюдался [59].

ГИПОКСИЯ И ЭМП

Одним из факторов регуляции ЭМП является гипоксия. Увеличение массы опухоли по мере ее роста приводит к дефициту кислорода и питательных веществ в ней. Этот «голод», с одной стороны, тормозит пролиферацию клеток, с другой – индуцирует в них «адаптационные» процессы, в частности, ЭМП, который позволяет опухолевым клеткам мигрировать к кровеносным сосудам. В адаптации клеток к гипоксии участвуют такие индуцируемые гипоксией белки, как транскрипционный фактор HIF-1 – гетеродимер, состоящий из субъединиц HIF-1 α и HIF-1 β [74, 75]. В условиях нормоксии HIF-1 α гидроксимирируется пролилгидроксилазой, что обуславливает его связывание с белком Хиппеля–Линдау (VHL) – маркером убиквитинирования. Взаимодействие VHL с HIF-1 α приводит к деградации HIF-1 α в протеасоме. При недостатке кислорода активность пролилгидроксилазы снижается, и HIF-1 α не подвергается быстрой деградации, поскольку отсутствие гидроксимирированных остатков пролина стабилизирует HIF-1 α [76]. HIF-1 α накапливается в клетке и димеризуется с HIF-1 β , образуя активный транскрипционный фактор, который транслоцируется в ядро, связывается там с участками HRE (hypoxia responsive element) на ДНК и активирует транскрипцию генов-мишеней.

Регуляция ЭМП при гипоксии обеспечивается, главным образом, факторами HIF-1 и Snail/Slug. Индукция ЭМП в условиях гипоксии показана на различных линиях опухолевых клеток [77, 78]. Гипоксия снижает экспрессию E-кадгерина, действуя через HIF-1 α -опосредованную экспрессию *SNAIL1*. Кроме того, HIF-1 α индуцирует экспрессию *LOX*, что приводит к стабилизации Snail [79].

В ответ на гипоксию в опухолевых клетках повышается уровень белка LOX, а подавление экспрессии/активности LOX предотвращает развитие метастазов. Высокий уровень LOX считается фактором клинически неблагоприятного прогноза, ассоциированным с метастазированием РМЖ и опухолей головы и шеи [80].

Yang и соавт. показано, что HIF-1 α регулирует активацию ЭМП, повышая уровень Snail в стволовых клетках рака желудка. Экспрессия HIF-1 α в этих клетках значительно возрастает в условиях гипоксии. С увеличением HIF-1 α повышается экспрессия Snail, виментина и N-кадгерина, а также снижается уровень E-кадгерина, что указывает на инициацию ЭМП. При гипоксии значительно увеличивается возможность миграции и инвазии стволовых клеток рака желудка [81].

Мы изучали взаимосвязь β -катенин- и Snail-зависимых путей в клетках РМЖ при гипоксии. И обнаружили Snail-зависимую активацию β -катенина. Активированный β -катенин регулирует экспрессию генов ответа на гипоксию и поддерживает устойчивость клеток РМЖ к пониженному парциальному давлению кислорода. Координированная активация системы белков Snail/ β -катенин/HIF-1 α может рассматриваться как важный фактор, определяющий устойчивость опухоли к гипоксии [82].

Нами показано, что клеточная линия HBL-100 РМЖ с нокдауном Snail более чувствительна к гипоксии, при которой наблюдается блок репликации и уменьшение доли митотических клеток. Кроме того, на чувствительность клеток РМЖ к гипоксии прямо влияет плотность культуры [83].

Таким образом, в результате ответа на гипоксию клетки приобретают мезенхимальный фенотип через ЭМП, индуцированный HIF-1,2 α и Snail/Slug. Эти фенотипические изменения могут регулироваться различными эпигенетическими факторами [76].

На рис. 4 показана регуляция многочисленных процессов, опосредованных Snail.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Snail В ОПУХОЛЯХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР

Snail и Slug аберрантно экспрессируются во многих опухолях, а также в опухоли-ассоциированных фибробластах и в макрофагах, заселяющих поврежденные ткани [84–86]. Многочисленные исследования показывают, что в прогрессии опухоли эти белки играют разную роль.

Экспрессия как *SNAIL1*, так и *SNAIL2* в опухолевых клетках может характеризовать степень злокачественности и служить прогностическим маркером заболевания. Распространение открытых баз с результатами секвенирования позволяет использовать различные биоинформатические инструменты для предварительной оценки прогноза заболевания. Подобный анализ проводят на начальном этапе поиска и валидации новых маркеров, а также клинически значимых критериев. Одна из таких баз – KM-plotter – содержит профили экспрессии

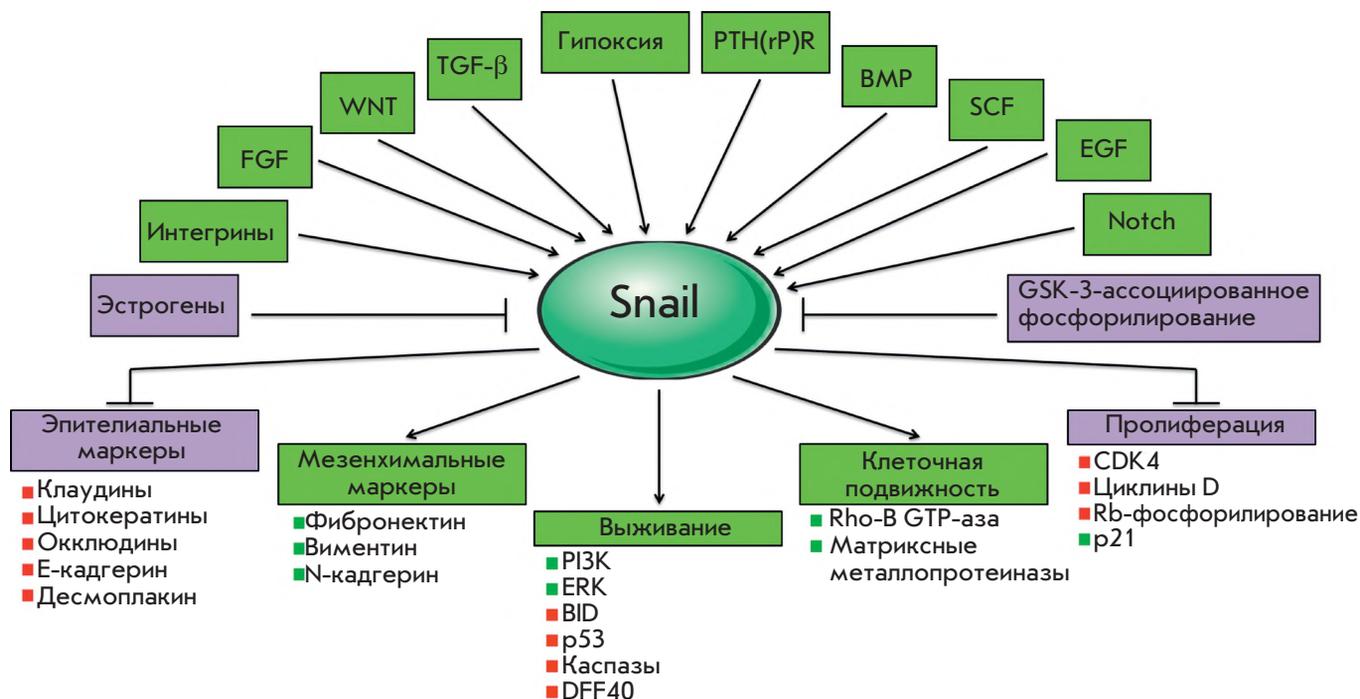


Рис. 4. Регуляция и основные мишени транскрипционного фактора Snail

генов из баз GEO, EGA и TCGA [87]. В KM-plotter можно оценить влияние экспрессии генов на общую выживаемость больных методом Каплана–Мейера [88]. Всего доступен анализ 54000 генов в новообразованиях 21 типа. Совокупные данные по экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* в опухолях каждого типа представлены в таблице. В анализ включены данные по экспрессии этих генов в 19 типах новообразований, и для четырех из них не найдено статистически значимых отличий (хотя бы по одному из показателей) в общей выживаемости. Показано статистически значимое влияние экспрессии *SNAI1* на медиану общей выживаемости при 12 типах новообразований. Наибольшее отличие медианы общей выживаемости обнаружено в случае плоскоклеточного рака шейки матки – медиана выживаемости в группе с низкой экспрессией *SNAI1* была в 2.4 раза выше, чем в группе с высокой экспрессией этого гена. Эти данные согласуются с результатами, представленными в недавней публикации Huilun Yang и соавт. [89], которые доказывают взаимосвязь *SNAI1* и *TWIST1* с активным метастазированием рака шейки матки. Кроме того, эти данные подтверждены с помощью иммуногистохимического анализа [90] 154 образцов опухолей шейки матки. Наименьшее (значимое) отличие в общей выживаемости в зависимости от уровня *SNAI1* выявлено для аденокарциномы желудка и прямой кишки. Интересно, что экспрессия *SNAI2* не влияет на показатели общей выживаемости при аденокар-

циноме прямой кишки. На ограниченность использования Snail в качестве отдельного (независимого) прогностического маркера рака прямой кишки указывают результаты [91], где маркеры ЭМП предлагают комбинировать с маркерами стволовых клеток, чтобы повысить прогностическую значимость каждого из показателей в отдельности. Схожие закономерности получены при изучении взаимосвязи экспрессии *SNAI2* с общей выживаемостью при 10 типах опухолей. В большинстве типов опухолей изменение экспрессии *SNAI2* имеет такую же тенденцию, как и у *SNAI1*, – высокая экспрессия маркера считается фактором неблагоприятного прогноза. Исключение из этого правила представляет рак тела матки: высокая экспрессия *SNAI2* при этом новообразовании соответствует более продолжительной общей выживаемости. Одним из объяснений такого наблюдения может быть низкая активность Slug в клетках рака тела матки. Так, ядерная локализация Slug выявлена лишь в 3.7% опухолевых образцов, т.е. клиническое значение этого показателя весьма ограничено [92]. По другим данным, в 25% случаев рака тела матки выявлена высокая экспрессия Slug, этот показатель связан с низкой выживаемостью, следовательно, его можно считать фактором неблагоприятного прогноза [93]. Уточнить прогностическую роль Slug (или доказать ее отсутствие) при раке тела матки еще предстоит.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в общей выживаемости больных РМЖ

Экспрессия *SNAI1* и *SNAI2* и общая выживаемость больных онкологическими заболеваниями: анализ данных, представленных в базе KM-plotter

Опухоль	Показатель			
	<i>SNAI1</i> *		<i>SNAI2</i> *	
	Общая выживаемость (медиана)	Статистическая значимость	Общая выживаемость (медиана)	Статистическая значимость
Рак мочевого пузыря	Низкая экспрессия (эксп.) = 42.33 мес., высокая эксп. = 28.63 мес.	$P = 0.0264$, $q > 0.5$	Низкая экспрессия (эксп.) = 47.33 мес., высокая эксп. = 20.77 мес.	$P = 0.0008$, $q = 0.2$
Плоскоклеточный рак шейки матки	Низкая эксп. = 68.4 мес., высокая эксп. = 27.9 мес.	$P = 0.027$, $q > 0.5$	Разница статистически незначима	
Аденокарцинома пищевода	Низкая эксп. = 46.83 мес., высокая эксп. = 20.33 мес.	$P = 0.0449$, $q > 0.5$	Разница статистически незначима	
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Низкая эксп. = 58.73 мес., высокая эксп. = 46.6 мес.	$P = 0.0398$, $q > 0.5$	Низкая эксп. = 58.73 мес., высокая эксп. = 37.77 мес.	$P = 0.0174$, $q > 0.5$
Светлоклеточный рак почки	Низкая эксп. = 73 мес., высокая эксп. = 37.03 мес.	$P = 0.0058$, $q > 0.5$	Низкая эксп. = 52.8 мес., высокая эксп. = 37.03 мес.	$P = 0.0323$, $q > 0.5$
Папиллярный почечно-клеточный рак почки	Низкая эксп. = 89.47 мес., высокая эксп. = 43.53 мес.	$P = 8.2e-5$, $q = 0.02$	Низкая эксп. = 86.97 мес., высокая эксп. = 43.8 мес.	$P = 0.0014$, $q > 0.2$
Аденокарцинома легкого	Низкая эксп. = 50.93 мес., высокая эксп. = 40.3 мес.	$P = 0.0124$, $q > 0.5$	Низкая эксп. = 54.4 мес., высокая эксп. = 35.77 мес.	$P = 0.0014$, $q > 0.5$
Плоскоклеточный рак легкого	Низкая эксп. = 72.33 мес., высокая эксп. = 35.83 мес.	$P = 0.0002$, $q = 0.05$	Разница статистически незначима	
Рак яичника	Низкая эксп. = 49.97 мес., высокая эксп. = 38.97 мес.	$P = 0.0089$, $q > 0.5$	Низкая эксп. = 46.13 мес., высокая эксп. = 38.7 мес.	$P = 0.0192$, $q > 0.5$
Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы	Разница статистически незначима		Низкая эксп. = 37.67 мес., высокая эксп. = 18.93 мес.	$P = 0.0006$, $q = 0.2$
Аденокарцинома прямой кишки	Низкая эксп. = 43.8 мес., высокая эксп. = 41.93 мес.	$P = 0.0384$, $q > 0.5$	Разница статистически незначима	
Саркома	Разница статистически незначима		Низкая эксп. = 86.63 мес., высокая эксп. = 48.87 мес.	$P = 0.001$, $q = 0.2$
Аденокарцинома желудка	Низкая эксп. = 43.8 мес., высокая эксп. = 41.93 мес.	$P = 0.0384$, $q > 0.5$	Низкая эксп. = 46.9 мес., высокая эксп. = 20.23 мес.	$P = 0.0013$, $q = 0.2$
Рак щитовидной железы	Низкая эксп. = не достигнута, высокая эксп. = не достигнута	$P = 3.3-6$, $q = 0.01$	Разница статистически незначима	
Рак тела матки	Низкая эксп. = 114.1 мес., высокая эксп. = 51.6 мес.	$P = 0.0614$, $q = 0.01$	Низкая эксп. = 36.87 мес., высокая эксп. = 78.4 мес.	$P = 0.0113$, $q \geq 0.01$

*При плоскоклеточном раке пищевода, раке печени, молочной железы и эндометриальном раке тела матки различия в экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* статистически незначимы.

в группах с различным уровнем *SNAI1* и *SNAI2* (база KM-plotter), в ряде работ показано важное клиническое значение маркеров ЭМП, в частности Snail, при этом заболевании. В клетках РМЖ наблюдается высокая экспрессия Notch (74%), Slug (36%), Snail (62%), N-кадгерина (77%), в то время как экспрессия E-кадгерина повышена примерно в 20% случаев [68]. Анализ 157 образцов РМЖ выявил статистически значимую корреляцию между экспрессией Snail и Slug и их коактиватора – фактора NF-κB [94]. По данным Сао и соавт., высокая экспрессия Snail и низкий уровень E-кадгерина коррелируют с количеством метастазов РМЖ в лимфатических узлах. Кроме того, высокий уровень Snail в значительной

степени связан с низкой экспрессией E-кадгерина, а повышенная экспрессия Slug – с увеличением N-кадгерина у пациентов с РМЖ [68].

В опухолевых клетках, имеющих морфологические признаки ЭМП (способность к миграции и инвазии), уровень Snail, Slug, ZEB1 выше, чем в клетках без признаков ЭМП [95]. Нокдаун генов *SNAI1* и *SNAI2* приводит к возвращению эпителиальной морфологии и существенному снижению количества клеток, мигрирующих в камере Бойдена. Feng и соавт. показали, что уровни Snail, E-кадгерина, Slug и Twist, но не N-кадгерина, в озлокачествленных эпителиальных клетках выше, чем в клетках доброкачественных новообразований [96].

Низкий уровень экспрессии E-кадгерина и высокий уровень N-кадгерина характерны для метастазов рака желудка и для недифференцированных опухолевых клеток, что коррелирует с плохим прогнозом. Высокая экспрессия Snail в первичной опухоли и низкая в метастазах коррелирует с дальнейшим увеличением метастазирования и негативным прогнозом [97].

Высокая экспрессия Snail, но не Slug, и низкая экспрессия E-кадгерина связаны с худшей выживаемостью при раке мочевого пузыря [98]. При раке шейки матки увеличение Snail и снижение E-кадгерина являются негативными прогностическими факторами. По последним данным экспрессия Snail является более значимым фактором прогноза этого заболевания, чем экспрессия других регуляторов ЭМП (Slug, ZEB1 и Twist) [99].

Сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста Her2/Neu стабилизирует Snail, способствуя лекарственной устойчивости рака желудка [100] и РМЖ [101]. Используя индуцибельную модель РМЖ с экспрессией Her2/Neu, Moody и соавт. обнаружили, что частота рецидивирования опухоли коррелирует с высоким уровнем Snail [102]. С повышением экспрессии Snail и Twist ассоциирован неблагоприятный прогноз эстрогенположительных форм РМЖ [103].

Таким образом, экспрессия маркеров ЭМП, в частности белков семейства Snail, связана со степенью злокачественности и, в целом, с прогрессией заболевания. Правомерно полагать, что исследованные маркеры ЭМП в ряде случаев могут быть прогностически значимыми [96]. Однако для внедрения в клиническую практику нужно выбрать методы анализа, валидировать их и доказать экономическую целесообразность использования новых маркеров.

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА Snail И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ

Белки-регуляторы ЭМП могут определять не только способность опухолевых клеток к метастазированию и инвазии, но и их устойчивость к генотоксическим и таргетным противоопухолевым препаратам. Механизмы такой резистентности опосредуются антиапоптотическим действием, снижением пролиферации и индукцией множественной лекарственной устойчивости. Роль Slug и Snail в формировании устойчивости к химио- и лучевой терапии показана в ряде исследований [104].

Так, уровень белка Snail повышен в опухолях и линиях клеток, устойчивых к цисплатину [105]. Кроме этого, Snail вызывает устойчивость к гемцитабину в моделях рака поджелудочной железы [106] и РМЖ [107], к эпопозиду – в модели мелкоклеточного рака легкого [108].

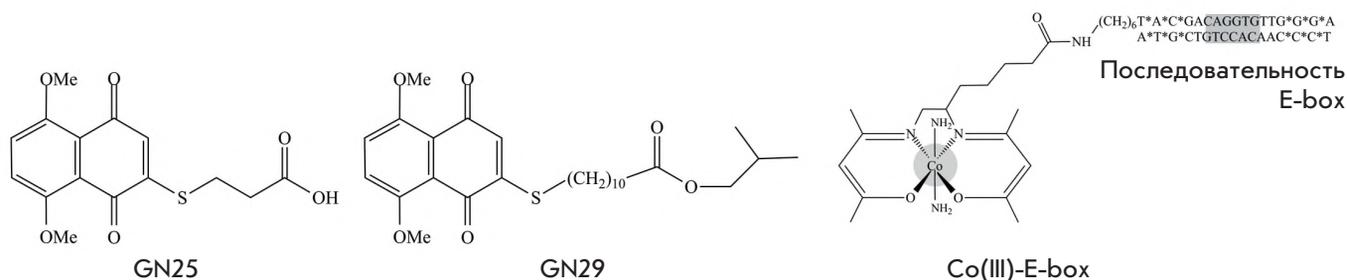
Haslehurst и соавт. показано, что в линии клеток рака яичника A2780, устойчивой к цисплатину, повышена экспрессия генов *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST* и *ZEB2*. Резистентные к цисплатину клетки имели мезенхимальный фенотип, межклеточные контакты отсутствовали, в то время как чувствительные клетки сохраняли эпителиальную морфологию. При нокадауне генов ключевых регуляторов ЭМП – Snail и Slug – клетки возвращались к исходному эпителиальному фенотипу [42].

Стабильность Snail при действии цисплатина обусловлена деубиквитинированием Snail белком USP1, который индуцируется при повреждении ДНК и стабилизирует ряд репарационных и антиапоптотических белков [109]. Сходным образом Snail стабилизируется деубиквитиназой USP27х, индуцируемой TGF-β, в модели устойчивости к цисплатину [110]. Репарационные ферменты PARP-1 и PARP-3 являются еще одним механизмом взаимосвязи повреждения ДНК и экспрессии Snail в ответ на химиотерапию. PARP-1 контролирует экспрессию Snail на уровне транскрипции в клетках, подвергшихся воздействию доксорубина, а ABT-888, ингибитор PARP-1, способен усиливать ответ клеток РМЖ (линия MDA-MB-231) на доксорубин. Ингибирование PARP-1 может повысить чувствительность опухолевых клеток *in vivo*, снижая экспрессию Snail [111]. Сходным образом истощение PARP-3 ингибирует TGF-β-зависимый ЭМП клеток РМЖ, предотвращая связывание Snail с E-кадгеринном и повышая чувствительность к химиопрепаратам [112].

Факторы транскрипции семейства Snail также опосредуют резистентность клеток к отдельным таргетным препаратам. Экспрессия Slug повышена в модели рака легкого, устойчивой к ингибитору EGFR gefitinibu, и в биоптатах пациентов, получавших ингибиторы EGFR. В этой модели Slug репрессировал каспазу-9 и проапоптотический белок Bim, а подавление Slug повышало чувствительность клеток к ингибиторам EGFR [113]. Snail определяет устойчивость клеток трижды негативного РМЖ к рапамицину и эверолимусу – ингибиторам протеинкиназы mTOR. В этой модели ингибитор гистондеацетилаз траметиниб подавлял Snail-индуцированный ЭМП [102].

Роль Snail и Slug в лекарственной устойчивости опухолевых клеток связана с репрессией генов проапоптотических белков PUMA, ATM, PTEN, p53, BID, каспазы-6 и дерепрессией генов белков, связанных с фенотипом стволовости [52, 55, 57]. Помимо антиапоптотического действия Snail также повышает экспрессию ABC-транспортёров – важнейший механизм множественной лекарственной устойчивости [114].

ПРЯМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ Snail



ОПОСРЕДОВАННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ Snail

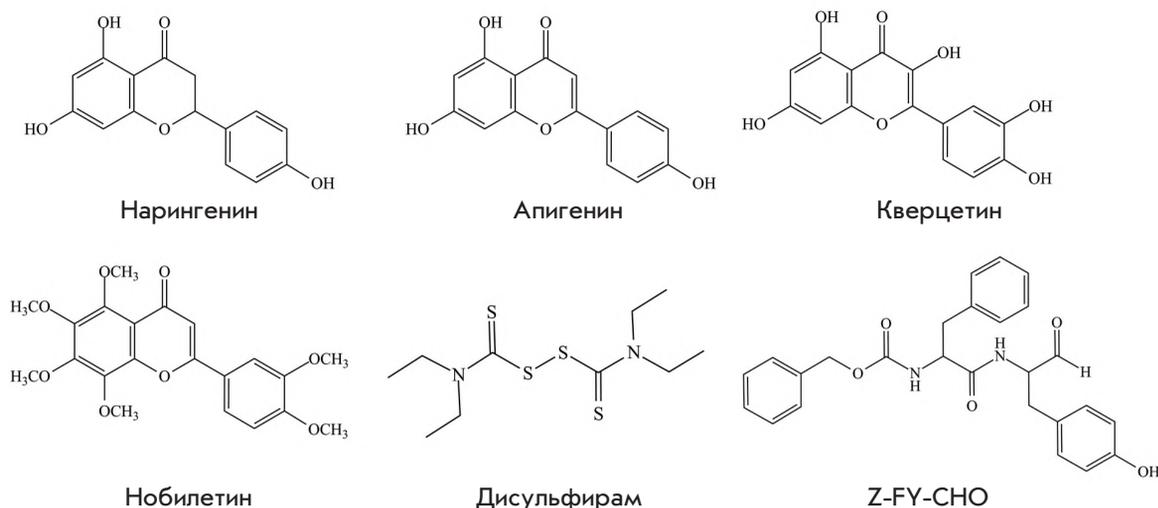


Рис. 5. Фармакологические ингибиторы функций Snail

Snail может регулировать иммунные реакции. Так, TGF- β индуцирует Snail в макрофагах, мигрирующих в очаг воспаления и в рану [81]. Опухоли с высоким уровнем экспрессии Snail содержат мало инфильтрирующих CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и повышенное количество проопухолевых макрофагов M2 [115]. Snail также индуцирует иммуносупрессию и иммунорезистентность через цитокин TSP1 и активируемые TGF- β регуляторные Т-клетки, снижающие экспрессию стимулирующих молекул в дендритных клетках, что подавляет цитотоксические Т-лимфоциты [116].

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) – небольшая популяция клеток, для которых характерны экспрессия маркеров стволовости и плюрипотентность. Считают, что ОСК – источник гетерогенности опухоли. В частности, клональность опухоли, поддерживаемая популяцией ОСК, является фактором химио- и радиорезистентности. Получены свидетельства в пользу того, что ОСК имеют повышенный метастатический потенциал, но механизмы этого процесса изучены недостаточно [117–119]. Показано,

что регулятор стволовости SOX2, индуцируемый фактором роста эндотелия сосудов (VEGF-A), запускает ЭМП и метастазирование. В линиях РМЖ и клетках нативных опухолей VEGF-A активирует экспрессию SOX2, что приводит к индукции *SNAI2* через miR-452, запуску ЭМП, увеличению инвазии и метастазированию. Таким образом, VEGF-A стимулирует SOX2- и Slug-зависимую инвазию [120]. Следовательно, сверхэкспрессия транскрипционного фактора ЭМП Slug повышает миграционную активность ОСК [96].

В результате активации сигнального пути SCF/c-Kit происходит увеличение уровня Slug, что обуславливает устойчивость клеток рака яичника к радиотерапии и способствует выживанию ОСК [57]. Кроме того, SCF/c-Kit/Slug опосредует лекарственную устойчивость клеток мезотелиомы человека. Нокдаун c-Kit/*KIT* или *SNAI2* увеличивает чувствительность клеток мезотелиомы к химиотерапевтическим агентам доксорубину, паклитакселу и винкристину. Трансфекция c-Kit/*KIT* в клетки мезотелиомы в присутствии SCF усиливает активность

Slug и повышает устойчивость к этим препаратам. Клетки мезотелиомы с высоким уровнем Slug устойчивы к лекарственной терапии [121].

Таким образом, белки семейства Snail могут принимать непосредственное участие в развитии резистентности к терапии и подавлении противоопухолевого иммунитета. Эти свойства Snail, наряду с участием в ЭМП, указывают на необходимость фармакологического ингибирования этих белков.

ВОЗМОЖНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ИНГИБИРОВАНИЯ Snail

Сигнальные пути с участием белков семейства Snail представляют интерес для поиска новых подходов в химиотерапии. Прямое фармакологическое ингибирование затруднено сложностью выбора функционального домена белка в качестве мишени. Тем не менее отдельные попытки успешно реализованы (рис. 5).

В качестве мишени Vistain и соавт. [122] предложили E-box – последовательность, с которой связывается Snail. Синтезирован комплекс Co(III), конъюгированный с гексануклеотидом CAGGTG. Проникая в клетку, комплекс Co(III)-E-box связывает Snail и препятствует его взаимодействию с ДНК. Созданные конструкции значительно снижали инвазивный потенциал опухолевых клеток. Таким образом, авторы надеются на высокую эффективность данного соединения в качестве терапевтического ингибитора прогрессирования опухоли и метастазирования РМЖ.

Проведен поиск химического ингибитора Snail [123]. В качестве мишени выбран комплекс Snail с p53. Была синтезирована серия соединений и найдены два лидерных (GN25 и GN29), которые увеличивали экспрессию p53 и разобщали его со Snail. Соединения GN25 и GN29 показали селективность для клеток с мутацией K-Ras и низкую токсичность для неопухолевых клеток. Однако влияние этих соединений на опухолевые клетки неоднозначно, а механизм их действия изучен недостаточно, поэтому еще рано говорить о клинических испытаниях этих веществ.

Описан ряд соединений, которые влияют на экспрессию Snail, но при этом не являются его прямыми ингибиторами. Дисульфирам (DSF), использующийся в терапии алкогольной зависимости, ингибирует NF- κ B. DSF ингибирует TGF- β -индуцированный ЭМП в клетках РМЖ, миграцию и инвазию, а также рост опухолевых трансплантатов. DSF подавляет сигнальный путь ERK/NF- κ B/Snail, приводя к МЭП [124]. На данный момент DSF проходит фазу 2 клинических испытаний для лечения пациентов со стадией 4 РМЖ в Чехии. Обнаружено, что Z-FY-CHO – се-

лективный ингибитор катепсина L, протеазы компонентов ВКМ – снижает экспрессию Snail и запускает МЭП в клетках рака предстательной железы с мезенхимальным фенотипом [125].

Способностью инициировать МЭП обладают фитоэстрогены, которые модулируют передачу сигналов посредством Snail и Twist1. Флавонон нарингенин понижал инвазивность клеток рака предстательной железы, блокируя Snail и Twist1 [126]. Схожая активность описана для нобилетина – флавоноида из цитрусовых растений. Это соединение влияет на сигнальные пути TGF- β , ZEB, Slug и Snail, оно способно подавлять инвазию и миграцию опухолевых клеток [127]. Интерес исследователей к потенциальным ингибиторам ЭМП природного происхождения подкреплен относительно низкой токсичностью этих соединений для неопухолевых тканей, а также антиканцерогенными свойствами [128–130]. Действительно, флавонон апигенин проявляет антипролиферативное действие на клетках РМЖ с мезенхимальными характеристиками [131]. Описано подавление экспрессии Snail, ЭМП и метастазирования клеток этим фитоэстрогеном [132–134]. Антиметастатическим эффектом обладает также флавоноид кверцетин [135]. Обработка клеток рака легкого кверцетином приводила к снижению их инвазивной и миграционной активности. Кверцетин влиял на сигнальный путь Akt-Snail, поддерживающий выживаемость клеток и способность к метастазированию. Кверцетин проходит ряд клинических испытаний в качестве средства для лечения пациентов с раком предстательной железы (фаза 2), легкого (фаза не указана) и почки (фаза 2). Для предотвращения ЭМП актуальным представляется создание соединений, инактивирующих белки семейства Snail и предотвращающих трансактивацию их генов-мишеней.

Способность перечисленных соединений ингибировать функции и активность Snail вселяет надежду, что эти вещества после более детального и тщательного изучения механизмов их действия будут участвовать в клинических испытаниях в качестве средств для лечения прогрессирующих и метастазирующих опухолей.

В настоящее время перед исследователями стоит задача модифицировать соединения, найти наилучший способ их доставки, а также разработать методы терапии совместно с другими цитотоксическими препаратами [136].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки семейства Snail – ключевые регуляторы ЭМП – модулируют множество процессов в онтогенезе и онкобиологии. Подробное изучение ЭМП

в опухолевых клетках определило важную роль этого процесса в инвазии и метастазировании. Транскрипционные факторы Snail являются специфическими «переключателями» эпителиального, более благоприятного фенотипа клеток, на агрессивный прометастатический. Именно поэтому молекулярные события, опосредованные этими белками, представляют интерес как мишени терапии, в частности, резистентных метастатических форм опухолей. Разработка фармакологических подходов к ингибированию Snail только начинается. Тем не менее охарактеризованы химические классы синтетических и природных соединений, воздействующих на транскрипционную активность, экспрессию Snail и иницирующих МЭП. Дальнейшее исследование ЭМП и его регуляторов перспективно для персонализированной терапии опухолей. ●

Авторы выражают благодарность А.А. Штилю за обсуждение работы и Е.А. Варламовой за помощь в оформлении рукописи.

Иллюстрации созданы с использованием шаблонов Servier Medical Art (лицензия Creative Commons Attribution 3.0 Unported); <https://smart.servier.com>.

При написании обзора использованы данные, находящиеся в открытом доступе (<https://clinicaltrials.gov/>; <https://www.uniprot.org/>; <https://kmpplot.com/analysis/>).

Работа поддержана грантом Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 14.W03.31.0020 с Институтом биологии гена РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heerboth S., Housman G., Leary M., Longacre M., Byler S., Lapinska K., Willbanks A., Sarkar S. // Clin. Transl. Med. 2015. V. 4. P. 1–13.
- Slattum G., Rosenblatt J. // Cancer. 2014. V. 14. № 7. P. 495–501.
- Hay E. // Dev. Dyn. 2005. V. 233. № 3. P. 706–720.
- Wang Y., Shi J., Chai K., Ying X., Zhou B. // Curr. Cancer Drug Targets. 2013. V. 13. № 9. P. 963–972.
- Murtuza A., Bulbul A., Shen J., Keshavarzian P., Woodward B., Lopez-Diaz F., Lippman S., Husain H. // Cancer Res. 2019. V. 79. № 4. P. 689–698.
- Vasiliou S., Diamandis E. // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2019. V. 56. № 3. P. 200–223.
- Aubry A., Galiacy S., Allouche M. // Cancers. 2019. V. 11. № 3. P. 275.
- Ukrainskaya V., Stepanov A., Glagoleva I., Knorre V., Belogurov A., Gabibov A. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 3. P. 55–63.
- Gonzalez D., Medici D. // Sci. Signal. 2014. V. 7. № 344. P. re8.
- Peinado H., Olmeda D., Cano A. // Nat. Rev. Cancer. 2007. V. 7. № 6. P. 415–428.
- Stankic M., Pavlovic S., Chin Y., Brogi E., Padua D., Norton L., Massagué J., Benezra R. // Cell Rep. 2013. V. 5. № 5. P. 1228–1242.
- Kim N.H., Kim H.S., Li X.Y., Lee I., Choi H.S., Kang S.E., Cha S.Y., Ryu J.K., Yoon D., Fearon E.R., et al. // Cell Biol. 2011. V. 195. № 3. P. 417–433.
- Siemens H., Jackstadt R., Hunten S., Kaller M., Menssen A., Gotz U., Hermeking H. // Cell Cycle. 2011. V. 10. № 24. P. 4256–4271.
- Murray S., Gridley T. // Cell Cycle. 2006. V. 5. № 22. P. 2566–2570.
- Haensel D., Dai X. // Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 2018. V. 247. № 3. P. 473–480.
- Nieto M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. № 3. P. 155–166.
- Nishioka R., Itoh S., Gui T., Gai Z., Oikawa K., Kawai M., Tani M., Yamaue H., Muragaki Y. // Exp. Mol. Pathol. 2010. V. 89. № 2. P. 149–157.
- Veltmaat J., Orelia C., Ward-Van Oostwaard D., van Rooijen M., Mummery C., Defize L.H. // Int. J. Dev. Biol. 2000. V. 44. № 3. P. 297–307.
- Georgakopoulos-Soares I., Chartoumpakis D., Kyriazopoulou V., Zaravinos A. // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 499.
- Pastushenko I., Blanpain C. // Trends Cell Biol. 2019. V. 29. № 3. P. 212–226.
- Katoh M., Katoh M. // Int. J. Mol. Med. 2003. V. 11. № 3. P. 383–388.
- Phillips S., Kuperwasser C. // Cell Adhes. Migr. 2014. V. 8. № 6. P. 578–587.
- Molina-Ortiz P., Villarejo A., MacPherson M., Santos V., Montes A., Souchelnytskyi S., Portillo F., Cano A. // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. P. e36132.
- Knorre D., Kudryashova N., Godovikova T. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 3. P. 29–51.
- Wu Y., Deng J., Rychahou P., Qiu S., Evers B., Zhou B. // Cancer Cell. 2009. V. 15. № 5. P. 416–428.
- Zhou B., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y., Gunduz M., Hung M. // Nat. Cell Biol. 2004. V. 6. № 10. P. 931–940.
- Liu T., Yu J., Deng M., Yin Y., Zhang H., Luo K., Qin B., Li Y., Wu C., Ren T., et al. // Nat. Commun. 2017. V. 8. № 1. P. 13923.
- Zhang K., Rodriguez-Aznar E., Yabuta N., Owen R., Mingot J., Nojima H., Nieto M., Longmore G. // EMBO J. 2012. V. 31. № 1. P. 29–43.
- Chang R., Zhang P., You J. // Open Life Sci. 2016. V. 11. № 1. P. 237–243.
- Lee J., Jung S., Yang K., Bae E., Ahn S., Park J., Seo D., Kim M., Ha J., Lee J., et al. // Nat. Cell Biol. 2017. V. 19. № 10. P. 1260–1273.
- Carver E., Jiang R., Lan Y., Oram K., Gridley T. // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. № 23. P. 8184–8188.
- Jiang R., Lan Y., Norton C., Sundberg J., Gridley T. // Dev. Biol. 1998. V. 198. № 2. P. 277–285.
- Chen Y., Gridley T. // Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 2013. V. 28. № 6. P. 1412–1421.
- Dale J., Malapert P., Chal J., Vilhais-Neto G., Maroto M., Johnson T., Jayasinghe S., Trainor P., Herrmann B., Pourquie O. // Dev. Cell. 2006. V. 10. № 3. P. 355–366.
- Arnoux V., Nassour M., L'Helgoualc'h A., Hipskind R., Savagner P. // Mol. Biol. Cell. 2008. V. 19. № 11. P. 4738–4749.

36. Hudson L., Newkirk K., Chandler H., Choi C., Fossey S., Parent A., Kusewitt D. // *J. Dermatol. Sci.* 2009. V. 56. № 1. P. 19–26.
37. Beyes S., Andrieux G., Schrempp M., Aicher D., Wenzel J., Antón-García V., Boerries M., Hecht A. // *Oncogene*. 2019. V. 38. P. 6647–6661.
38. Maturi V., Morén A., Enroth S., Heldin C.-H., Moustakas A. // *Mol. Oncol.* 2018. V. 12. № 7. P. 1153–1174.
39. Strouhalova K., Pfechová M., Gandalovičová A., Brábek J., Gregor M., Rosel D. // *Cancers*. 2020. V. 12. № 1. P. 184. doi: 10.3390/cancers12010184
40. Wang Y., Zhao X., Shuai Z., Li C., Bai Q., Yu X., Wen Q. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. № 5. P. 7388–7393.
41. Wu W., You R., Cheng C., Lee M., Lin T., Hu C. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 17753.
42. Haslehurst A.M. The role of the epithelial-mesenchymal transition in aggressive tumour phenotypes. Dissertation. Queen's University. Kingston, Ontario, Canada, 2014.
43. LaBonne C., Bronner-Fraser M. // *Dev. Biol.* 2000. V. 221. № 1. P. 195–205.
44. Batlle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., García De Herreros A. // *Nat. Cell. Biol.* 2000. V. 2. № 2. P. 84–89.
45. Shields M.A., Krantz S.B., Bentrem D.J., Dangi-Garimella S., Munshi H.G. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 9. P. 6218–6229.
46. Shields M.A., Dangi-Garimella S., Krantz S.B., Bentrem D.J., Munshi H.G. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 12. P. 10495–10504.
47. del Barrio M.G., Nieto M.A. // *Dev. Camb. Engl.* 2002. V. 129. № 7. P. 1583–1593.
48. Fan M., Xu Y., Hong F., Gao X., Xin G., Hong H., Dong L., Zhao X // *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2016. V. 38. № 4. P. 1319–1332.
49. Ungefroren H., Witte D., Lehnert H. // *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2018. V. 247. № 3. P. 451–461.
50. Faure S., Fort P. // *Small GTPases*. 2011. V. 2. № 6. P. 310–313.
51. Li Y., Zhou C., Gao Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 452. № 3. P. 490–496.
52. Vega S., Morales A., Ocaña O.H., Valdés F., Fabregat I., Niet M.A. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 10. P. 1131–1143.
53. Mittal M.K., Singh K., Misra S., Chaudhuri G. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 1. P. 469–479.
54. Assani G., Zhou Y. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 17. № 1. P. 23–30.
55. Kajita M., McClinic K.N., Wade P.A. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 17. P. 7559–7566.
56. Escrivà M., Peiró S., Herranz N., Villagrasa P., Dave N., Montserrat-Sentís B., Murray S.A., Francí C., Gridley T., Virtanen I., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 5. P. 1528–1540.
57. Kurrey N.K., Jalgaonkar S.P., Joglekar A.V., Ghanate A.D., Chaskar P., Doiphode R.Y., Bapat S.A. // *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2009. V. 27. № 9. P. 2059–2068.
58. Lee S., Lee S., Jung Y., Xu Y., Kang H.S., Ha N., Park B. // *Neoplasia*. 2009. V. 11. № 1. P. 22–31.
59. Khamidullina A.I., Yastrebova M.A., Scherbakov A.M., Tatarskiy V.V. // *Ann. Oncol.* 2019. V. 30. Sup. 5. P. v24.
60. Gavert N., Ben-Ze'ev A. // *Trends Mol. Med.* 2008. V. 14. № 5. P. 199–209.
61. Piedra M.E., Ros M.A. // *Dev. Camb. Engl.* 2002. V. 129. № 14. P. 3431–3440.
62. Gotzmann J., Mikula M., Eger A., Schulte-Hermann R., Foisner R., Beug H., Mikulits W. // *Mutat. Res.* 2004. V. 566. № 1. P. 9–20.
63. Wu X., Cai J., Zuo Z., Li J. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 114. P. 108708.
64. Liu J.-Y., Jiang L., He T., Liu J., Fan J., Xu X., Tang B., Shi Y., Zhao Y.-L., Qian F., et al. // *Cell Death Dis.* 2019. V. 10. № 3. P. 162.
65. Li J., Xu H., Wang Q., Wang S., Xiong N. // *Cancer Med.* 2019. V. 8. № 2. P. 783–794.
66. Massagué J. // *Cell.* 2008. V. 134. № 2. P. 215–230.
67. Vincent T., Neve E., Johnson J.R., Kukalev A., Rojo F., Albanell J., Pietras K., Virtanen I., Philipson L., Leopold P.L., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 8. P. 943–950.
68. Cao Y., Wan G.X., Sun J.P., Cui X.B., Hu J.M., Liang W.H., Zheng Y.Q., Li W.Q., Li F. // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2015. V. 31. № 2. P. 70–76.
69. Leong K.G., Niessen K., Kulic I., Raouf A., Eaves C., Pollet I., Karsan A. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. № 12. P. 2935–2948.
70. Julien S., Puig I., Caretti E., Bonaventure J., Nelles L., van Roy F., Dargemont C., de Herreros A.G., Bellacosa A., Larue L. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 53. P. 7445–7456.
71. Scherbakov A., Andreeva O., Shatskaya V., Krasil'nikov M. // *J. Cell. Biochem.* 2012. V. 113. № 6. P. 2147–2155.
72. Stemmer V., de Craene B., Berx G., Behrens J. // *Oncogene* 2008. V. 27. № 37. P. 5075–5080.
73. Lu X., Yan C., Huang Y., Shi D., Fu Z., Qiu J., Yin Y. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 24. P. 37177–37191.
74. Al Tameemi W., Dale T.P., Al-Jumaily R., Forsyth N.R. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 4.
75. Semenza G.L. // *Nat. Rev. Cancer*. 2003. V. 3. № 10. P. 721–732.
76. Yeo C.D., Kang N., Choi S.Y., Kim B.N., Park C.K., Kim J.W., Kim Y.K., Kim S.J. // *Korean J. Intern. Med.* 2017. V. 32. № 4. P. 589–599.
77. Hill R.P., Marie-Egyptienne D.T., Hedley D.W. // *Semin. Radiat. Oncol.* 2009. V. 19. № 2. P. 106–111.
78. Kim W.Y., Perera S., Zhou B., Carretero J., Yeh J.J., Heathcote S.A., Jackson A.L., Nikolinos P., Ospina B., Naumov G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 8. P. 2160–2170.
79. Krishnamachary B., Zagzag D., Nagasawa H., Rainey K., Okuyama H., Baek J.H., Semenza G.L. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 5. P. 2725–2731.
80. Erler J.T., Bennewith K.L., Cox T.R., Lang G., Bird D., Koong A., Le Q.T., Giaccia A.J. // *Cancer Cell.* 2009. V. 15. № 1. P. 35–44.
81. Yang S.W., Zhang Z.G., Hao Y.X., Zhao Y.L., Qian F., Shi Y., Li P.-A., Liu C.Y., Yu P.W. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 6. P. 9535–9545.
82. Scherbakov A., Stefanova L., Sorokin D., Semina S., Berstein L., Krasil'nikov M. // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 20. P. 3150–3159.
83. Yastrebova M., Khamidullina A., Scherbakov A., Tatarskiy V. Transcription factor Snail leads to resistance of breast cancer cells to hypoxia. // *Proc. 44th FEBS congress.* July 6–11. 2019. Krakow, Poland.
84. Grubben C., Fryns J.P., De Zegher F., Van Den Berghe H. // *Genet. Couns. Geneva Switz.* 1990. V. 1. № 2. P. 103–109.
85. Shirley S.H., Greene V.R., Duncan L.M., Torres Cabala C., Grimm E.A., Kusewitt D.F. // *Am. J. Pathol.* 2012. V. 180. № 6. P. 2479–2489.
86. Zhang T., Chen X.U., Chu X., Shen Y.I., Jiao W., Wei Y., Qiu T., Yan G., Wang X., Xu L. // *Oncol. Lett.* 2016. V. 11. № 1. P. 306–310.
87. Nagy Á., Lániczky A., Menyhart O., Gyórfy B. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 9227.
88. Lira R.P.C., Antunes-Foschini R., Rocha E.M. // *Arq. Bras. Oftalmol.* 2020. V. 83. № 2. P. 5–7.
89. Yang H., Hu H., Gou Y., Hu Y., Li H., Zhao H., Wang B., Li P,

- Zhang Z. // *Int. J. Clin. Oncol.* 2018. V. 23. № 2. P. 321–328.
90. Gong X., Tao Y., Zhou L., Yu L., Wu S., Song W., Wang D., Cheng Z. // *J. Southern Med. Univ.* 2015. V. 35. № 12. P. 1733–1738.
91. Choi J.E., Bae J.S., Kang M.J., Chung M.J., Jang K.Y., Park H.S., Moon W.S. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 38. № 3. P. 1695–1705.
92. Tanaka Y., Kawaguchi Y.T., Fujiwara S., Yoo S., Tsunetoh S., Takai M., Kanemura M., Tanabe A., Ohmichi M. // *Cancer Biol. Ther.* 2013. V. 14. № 1. P. 13–19.
93. Kihara A., Wakana K., Kubota T., Kitagawa M. // *Histopathology.* 2016. V. 69. № 3. P. 374–382.
94. Scherbakov A., Gershtein E., Korotkova E., Ovchinnikova L., Ovsii O., Ermilova V., Gens G., Kushlinskii N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 160. № 6. P. 802–806.
95. Noh H.S., Hah Y.S., Ha J.H., Kang M.Y., Zada S., Rha S.Y., Kang S.S., Kim H.J., Park J.Y., Byun J.H., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 4. P. 4632–4646.
96. Feng X., Zhao L., Shen H., Liu X., Yang Y., Lv S., Niu Y. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 20. P. 33365–33374.
97. Okubo K., Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Matsushita D., Kijima T., Amatatsu M., Uchikado Y., Kijima Y., Maemura K., et al. // *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* 2017. V. 20. № 5. P. 802–810.
98. Yu Q., Zhang K., Wang X., Liu X., Zhang Z. // *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR.* 2010. V. 29. P. 119.
99. Tian Y., Qi P., Niu Q., Hu X. // *Front. Mol. Biosci.* 2020. V. 7. P. 22.
100. Huang D., Duan H., Huang H., Tong X., Han Y., Ru G., Qu L., Shou C., Zhao Z. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20502.
101. Desai K., Aiyappa R., Prabhu J.S., Nair M.G., Lawrence P.V., Korlimarla A., Ce A., Alexander A., Kaluve R.S., Manjunath S., et al. // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 3. P. 1010428317695028. Doi: 10.1177/1010428317695028.
102. Moody S.E., Perez D., Pan T., Sarkisian C.J., Portocarrero C.P., Sterner C.J., Notorfrancesco K.L., Cardiff R.D., Chodosh L.A. // *Cancer Cell.* 2005. V. 8. № 3. P. 197–209.
103. van Nes J.G., de Kruijff E.M., Putter H., Faratian D., Munro A., Campbell F., Smit V., Liefers G.J., Kuppen P., van de Velde C.J.H., et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 133 (1). P. 49–59.
104. Du B., Shim J.S. // *Molecules.* 2016. V. 21. № 7. P. 965. Doi: 10.3390/molecules21070965.
105. Cao L., Wan Q., Li F., Tang C.E. // *BMB Rep.* 2018. V. 51. № 9. P. 456–461.
106. Zheng X., Carstens J.L., Kim J., Scheible M., Kaye J., Sugimoto H., Wu C.C., LeBleu V.S., Kalluri R. // *Nature.* 2015. V. 527. № 7579. P. 525–530.
107. Olmeda D., Moreno-Bueno G., Flores J.M., Fabra A., Portillo F., Cano A. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 24. P. 11721–11731.
108. Cañadas I., Rojo F., Taus Á., Arpi O., Arumí-Uría M., Pijuan L., Menéndez S., Zazo S., Dómine M., Salido M., et al. // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2014. V. 20. № 4. P. 938–950.
109. Sonogo M., Pellarin I., Costa A., Vinciguerra G.L., Coan M., Kraut A., D'Andrea S., Dall'Acqua A., Castillo-Tong D.C., Califano D., et al. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 5. P. eaav3235.
110. Lambies G., Miceli M., Martínez-Guillamon C., Olivera-Salguero R., Peña R., Frías C.P., Calderón I., Atanassov B.S., Dent S.Y., Arribas J., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 1. P. 33–46.
111. Mariano G., Ricciardi M.R., Trisciuglio D., Zampieri M., Ciccarone F., Guastafierro T., Calabrese R., Valentini E., Tafuri A., Del Bufalo D., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 17. P. 15008–15021.
112. Karicheva O., Rodriguez-Vargas J.M., Wadier N., Martin-Hernandez K., Vauchelles R., Magroun N., Tissier A., Schreiber V., Dantzer F. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 39. P. 64109–64123.
113. Chang T.H., Tsai M.F., Su K.Y., Wu S.G., Huang C.P., Yu S.L., Yu Y.L., Lan C.C., Yang C.H., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 183. № 8. P. 1071–1079.
114. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. // *Cell Death Dis.* 2011. V. 2. P. 179.
115. Dongre A., Rashidian M., Reinhardt F., Bagnato A., Keckesova Z., Ploegh H.L., Weinberg R.A. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 15. P. 3982–3989.
116. Kudo-Saito C., Shirako H., Takeuchi T., Kawakami Y. // *Cancer Cell.* 2009. V. 15. № 3. P. 195–206.
117. Lee K.S., Choi J.S., Cho Y.W. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 512. № 3. P. 511–516.
118. Srivastava A.K., Banerjee A., Cui T., Han C., Cai S., Liu L., Wu D., Cui R., Li Z., Zhang X., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 9. P. 2314–2326.
119. Izumi D., Toden S., Ureta E., Ishimoto T., Baba H., Goel A. // *Cell Death Dis.* 2019. V. 10. № 4. P. 267.
120. Kim M., Jang K., Miller P., Picon-Ruiz M., Yeasky T.M., El-Ashry D., Slingerland J.M. // *Oncogene.* 2017. V. 36. № 36. P. 5199–5211.
121. Catalano A., Rodilossi S., Rippo M.R., Caprari P., Procopio A. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 45. P. 46706–46714.
122. Vistain L.F., Yamamoto N., Rathore R., Cha P., Meade T.J. // *Chembiochem. Eur. J. Chem. Biol.* 2015. V. 16. № 14. P. 2065–2072.
123. Lee S.H., Shen G.N., Jung Y.S., Lee S.J., Chung J.Y., Kim H.S., Xu Y., Choi Y., Lee J.W., Ha N.C., et al. // *Oncogene.* 2010. V. 29. № 32. P. 4576–4587.
124. Han D., Wu G., Chang C., Zhu F., Xiao Y., Li Q., Zhang T., Zhang L. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 38. P. 40907–40919.
125. Burton L.J., Dougan J., Jones J., Smith B.N., Randle D., Henderson V., Odero-Marah V.A. // *Mol. Cell. Biol.* 2017. V. 37. № 5. P. e00297-16.
126. Han K.Y., Chen P.N., Hong M.C., Hseu Y.C., Chen K.M., Hsu L.S., Chen W.J. // *Anticancer Res.* 2018. V. 38. № 12. P. 6753–6758.
127. Ashrafizadeh M., Zarrabi A., Saberifar S., Hashemi F., Hushmandi K., Hashemi F., Moghadam E.R., Mohammadinejad R., Najafi M., Garg M. // *Biomedicines.* 2020. V. 8. № 5. P. 110.
128. Lamartiniere C.A., Wang J., Smith-Johnson M., Eltoum I.E. // *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2002. V. 65. № 2. P. 228–238.
129. Martinović L.S., Peršurić Ž., Pavelić K. // *Molecules.* 2020. V. 25. № 9. P. 2222.
130. Amawi H., Ashby C.R., Samuel T., Peraman R., Tiwari A.K. // *Nutrients.* 2017. V. 9. № 8. P. 911.
131. Scherbakov A., Andreeva O. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 3. P. 133–139.
132. Qin Y., Zhao D., Zhou H., Wang X.H., Zhong W.L., Chen S., Gu W.G., Wang W., Zhang C.H., Liu Y.R., et al. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 27. P. 41421–41431.
133. Chang J.H., Cheng C.W., Yang Y.C., Chen W.S., Hung W.Y., Chow J.M., Chen P.S., Hsiao M., Lee W.J., Chien M.H. // *Exp. Clin. Cancer Res. CR.* 2018. V. 37. № 1. P. 199.
134. Erdogan S., Doganlar O., Doganlar Z.B., Serttas R., Turkecul K., Dibirdik I., Bilir A. // *Life Sci.* 2016. V. 162. P. 77–86.
135. Chang J.H., Lai S.L., Chen W.S., Hung W.Y., Chow J., Hsiao M., Lee W., Chien M. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Cell Res.* 2017. V. 1864. № 10. P. 1746–1758.
136. Kothari A.N., Mi Z., Zapf M., Kuo P.C. // *Clin. Transl. Med.* 2014. V. 3. P. 35.

УДК 577.27

Механизмы функционирования белка PGLYRP1/Tag7 во врожденном и приобретенном иммунитете

Д. В. Яшин*, Л. П. Сащенко, Г. П. Георгиев

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: yashin_co@mail.ru

Поступила в редакцию 29.07.2020

Принята к печати 19.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11102

РЕФЕРАТ Одним из перспективных направлений современной молекулярной биологии является поиск новых белков, регулирующих различные этапы иммунного ответа, и изучение молекулярных механизмов действия этих белков. К таким белкам относится многофункциональный белок PGLYRP1/Tag7, принадлежащий к семейству PGRP-S, ген которого был открыт у мышей в 1996 г. в Институте биологии гена РАН. PGLYRP1/Tag7 классифицирован как белок врожденного иммунитета, но также может участвовать в регуляции иммунных механизмов приобретенного иммунитета. В данной работе рассмотрено участие PGLYRP1/Tag7 в индукции механизмов антибактериальной защиты, а также в формировании субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, обеспечивающих гибель опухолевых клеток. Подчеркнуто, что различная функциональная активность Tag7 в иммунном ответе обуславливается его способностью взаимодействовать с различными белками, создавая стабильные белковые комплексы. В комплексе с Hsp70 Tag7 способен индуцировать гибель опухолевых клеток, несущих рецептор TNFR1. В комплексе с белком Mts1 (S100A4) Tag7 способен стимулировать движение цитотоксических лимфоцитов как врожденного, так и приобретенного иммунитета к очагу поражения. Участие Tag7 в регуляции иммунологических процессов позволяет рассматривать его в качестве перспективного агента для терапии опухолей. На основе этих свойств Tag7 созданы аутологичные вакцины, прошедшие первую и вторую фазы клинических испытаний на пациентах с терминальной стадией меланомы и рака почек. Выделенный с помощью ограниченного протеолиза С-концевой пептид Tag7 защищает хрящевую и костную ткань голеностопного сустава мышей при индуцированном аутоиммунном артрите и может оказаться перспективным лекарственным соединением, блокирующим развитие воспалительных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА PGLYRP1/Tag7, цитотоксичность, антибактериальный эффект, противоопухолевая терапия, Mts1, Hsp70, HspBP1, TNFR1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Tag7 (tumor antagonistic gene) – белковый продукт гена антагониста опухолей 7; PGRP (peptide glycane recognizing protein) – белок, распознающий пептидогликан; ПАФ – полный адьювант Фрейнда; Mts1 – метастазин 1; Hsp70 – белок теплового шока 70 кДа.

ВВЕДЕНИЕ

Для понимания способов защиты организма от клеток с чужеродными или видоизмененными антигенами необходимо иметь представление о механизмах действия регуляторных и эффекторных лимфоцитов и об активации таких лимфоцитов. Понимание этих процессов важно для проведения противовоспалительной и противоопухолевой терапии. В связи с этим одним из направлений современной иммунологии является изучение белков, вовлеченных в работу врожденного и адаптивного иммунитета, позволяющее глубже понять основы иммунного ответа и причины сбоев при различных патологиях. Перспективным представляется поиск новых бел-

ков, регулирующих активность клеток, участвующих в иммунном ответе, и изучение молекулярных механизмов действия этих белков. Один из таких белков – белок PGLYRP1/Tag7.

Ген этого белка был открыт у мышей в 1996 г. в Институте биологии гена РАН в лаборатории одного из авторов (Георгия Павловича Георгиева) путем вычитания библиотек кДНК из метастазирующей и не метастазирующей линий опухолевых клеток мыши. Белок получил техническое название Tag7 [1]. Оказалось, что этот белок играет важную роль в противоопухолевой защите [2], поэтому его название можно расшифровать как белковый продукт гена антагониста опухолей (tumor antagonistic gene).

В 1998 г. Канг и соавт. [3] нашли в гемолимфе насекомых ген, структура которого была в высокой степени гомологична структуре гена *tag7*. Продукт этого гена был способен связываться с пептидогликанами клеточной стенки бактерий, он получил название PGRP (peptide glycane recognizing protein) [3]. Гомолог гена *PGRP* у мышей по структуре идентичен ранее описанному гену *tag7* [4, 5], т.е. Tag7 и PGRP – это один и тот же белок. Позднее, когда обнаружили семейство этих генов, термин PGRP был заменен на PGRP-S (small).

Дальнейшие функциональные исследования Tag7/PGRP-S пошли в двух направлениях. Исследователи в европейских лабораториях и в лабораториях США сосредоточились на изучении роли Tag7/PGRP-S во врожденном антибактериальном иммунитете. В ИБГ РАН в основном изучали механизмы противоопухолевого действия этого белка и связанные с этим проблемы.

СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ PGRP/Tag7

Белок Tag7/PGRP-S входит в состав небольшого белкового семейства. Члены этого семейства различаются длиной транскрипта: внеклеточный PGRP-S (короткая форма) [1, 3], длинный трансмембранный PGRP-L [5–7] и промежуточный PGRP-I [6]. Структурные исследования выявили на С-концевом участке аминокислотной последовательности всех белков этого семейства высококонсервативный участок из 160 аминокислотных остатков. Этот участок имеет три расположенных рядом PGR-домена, соединенных участками с консервативной аминокислотной последовательностью [6]. Только у PGRP-S перед PGR-доменом находится сигнальный пептид, свидетельствующий о способности PGRP-S секретироваться клеткой [5].

У человека обнаружены четыре белка семейства PGRP, обозначенные PGLYRP1, 2, 3 и 4. Первый соответствует Tag7/PGRP-S [8]. Он состоит из 196 аминокислот, имеет один сигнальный пептид и один PGR-домен. Ген этого белка экспрессируется в костном мозге, тимусе, эмбриональной печени, полиморфно-ядерных лимфоцитах, в лимфоидных клетках двенадцатиперстной кишки, селезенки, лимфоузлов, в альвеолярном эпителии и эндотелии легких [6, 9].

Анализ кристаллической структуры белков PGRP выявил лигандсвязывающий участок, узнающий специфическую последовательность пептидогликана. Также обнаружен участок белок-белкового узнавания, образованный специфической гидрофобной бороздкой и остатками консервативных аминокислот: Leu65, Arg18, Thr90, Glu93, Phe94, Leu133 [10].

Структура PGLYRP1/Tag7 обуславливает его функциональную активность. Связываясь с пептидогликаном, он может участвовать в активации антибактериальной защиты. Участки белок-белкового взаимодействия позволяют обеспечить взаимодействие PGLYRP1/Tag7 с другими белками с образованием стабильных комплексов, участвующих в индукции иммунного ответа. PGLYRP1/Tag7 обычно относят к белкам врожденного иммунитета, что не вполне соответствует действительности (см. ниже). Его участие в регуляции иммунной защиты исследуется достаточно широко. Можно выделить три основных направления в изучении функциональной активности PGLYRP1/Tag7: (1) участие PGLYRP1/Tag7 в антибактериальной защите, (2) роль Tag7 в активации лимфоцитов человека, (3) участие Tag7 в противоопухолевой терапии. В этой работе подробно рассмотрены эти направления, характеризующие PGLYRP1/Tag7 как активного регулятора иммунного ответа.

МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PGRP ВО ВРОЖДЕННОМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ИММУНИТЕТЕ У НАСЕКОМЫХ

У насекомых белки PGRP могут индуцировать антибактериальный иммунный ответ через рецептор Toll или путь Imd [11–13].

После узнавания пептидогликана белки PGRP насекомых взаимодействуют с сериновой протеазой Grass, которая инициирует протеолитический каскад, заканчивающийся расщеплением белка Spatzle. Один из образующихся при этом фрагментов, Spatzle, образует гомодимер, вызывающий димеризацию и активацию Toll-рецептора, который далее индуцирует противомикробный ответ [14]. При активации Toll-независимого пути иммунного ответа белок PGRP-L взаимодействует с Imd. Последний индуцирует второй сигнальный путь, также приводящий к секреции антимикробных пептидов [11, 15–17].

МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PGRP ВО ВРОЖДЕННОМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ ИММУНИТЕТЕ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Все четыре белка PGRP человека и других млекопитающих являются растворимыми секретруемыми белками, обладающими как узнающей, так и эффекторной функциями [18, 19]. PGLYRP1, 3 и 4 способны непосредственно лизировать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [20–23]. PGLYRP3 является пептидогликан-амидогидролазой [24, 25].

Каждый из этих белков содержит один или два домена PGRP с сайтом связывания, специфичным

для мурамилпептидного фрагмента бактериального пептидогликана [18, 19]. Кроме того, PGRP способны взаимодействовать с липотейхоевой кислотой и липополисахаридом [22, 26]. Таким образом, PGRP взаимодействуют со всей наружной мембраной грамотрицательных бактерий [27].

Для лизиса бактерий PGRP использует три цитотоксических механизма. Во-первых, PGRP индуцирует окислительный стресс за счет повышенного образования пероксида водорода (H_2O_2) и гидроксильных радикалов ($HO\cdot$) [27, 28]. Во-вторых, PGRP вызывает тиоловый стресс, приводящий к истощению более 90% внутриклеточных тиолов. Третьим антибактериальным эффектом является металлический стресс, приводящий к увеличению концентрации внутриклеточных ионов Zn^{2+} и Cu^+ [27, 28]. Каждая стрессовая реакция в отдельности является только бактериостатической, и лишь комбинированная индукция всех трех стрессовых реакций является бактерицидной [27].

Собственный антибактериальный эффект PGRP усиливается при совместной работе с клетками врожденного иммунитета. Например, фагоцитирующие клетки при фагоцитозе бактерий накачивают в фаголизосомы не только кислородные радикалы, но и Cu^+ и Zn^{2+} для усиления антибактериального эффекта [29, 30]. В ответ на это бактерии повышают экспрессию экспортеров Cu^+ и Zn^{2+} [27]. Белки PGRP предотвращают эти изменения, способствуя лизису бактерий [28]. Показано также, что PGRP могут работать синергически с антимикробными пептидами [31]. И наконец, показано взаимодействие PGRP-S с рецептором врожденного иммунитета TREM1, включающим провоспалительный иммунный ответ. Это взаимодействие будет рассмотрено ниже. Синергическое взаимодействие с другими защитными механизмами хозяина еще больше усиливает антибактериальную эффективность PGRP и предотвращает развитие резистентности, делая PGRP важным компонентом врожденного антибактериального иммунитета.

PGLYRP1/Tag7 В КОМПЛЕКСЕ С Hsp70 УБИВАЕТ МНОГИЕ ТИПЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В первых работах было показано, что кондиционная среда опухолевых клеток VMR-0, трансфицированных конструкцией, обеспечивающей продукцию Tag7, обладает цитотоксическим эффектом для клеток VMR-0. Антитела к Tag7 нейтрализовали этот эффект, что позволило сделать вывод о цитотоксичности Tag7 [2].

Однако другой группой исследователей показано, что PGRP-S, экспрессированный в клетках *Escherichia coli*, не обладает цитотоксической активностью [4].

Далее оказалось, что Tag7, полученный в дрожжевой системе, также не обладает токсическим действием. Он, однако, способен образовывать стабильный эквимольный комплекс с основным белком теплового шока Hsp70, который и обладает высокой цитотоксичностью [32]. Комплекс Tag7-Hsp70 при его концентрации 10^{-10} М способен индуцировать клеточную смерть в широком спектре опухолевых клеточных линий.

Для создания стабильного комплекса важно участие двух доменов Hsp70. Tag7 может соединяться с пептидсвязывающим доменом Hsp70 и даже с 14-членным пептидом этого домена, находящегося на поверхности опухолевых клеток и играющего существенную роль в активации NK-клеток [33]. Однако комплексы Tag7 с этими фрагментами Hsp70 обладали низкой цитотоксической активностью, и присутствие АТФ-связывающего домена Hsp70 приводило к образованию высокоактивного цитотоксического комплекса [32].

Также показано, что клеточная линия Cos-1, трансфицированная геном tag7, выделяет в кондиционную среду комплекс Tag7-Hsp70, убивающий опухолевые клетки. Секретия этого комплекса осуществляется при помощи аппарата Гольджи [32]. Повидимому, клетки VMR-0, трансфицированные геном tag7, также выделяют Tag7 в комплексе с Hsp70, и этим объясняется Tag7-зависимая цитотоксическая активность кондиционной среды этих клеток.

Внутриопухолевое введение комплекса Tag7-Hsp70 тормозило рост опухолей. Так, инъекции комплекса Tag7-Hsp70 мышам, которым подкожно ввели клетки агрессивной меланомы М3, подавляли рост опухолей и более чем в 2 раза увеличивали продолжительность жизни животных [34].

Показано также, что полученные на 6-е сут культивирования с цитокином IL-2 ЛАК-клетки после инкубации с опухолевыми клетками-мишенями выделяют в кондиционную среду цитотоксический комплекс Tag7-Hsp70. Ингибитор аппарата Гольджи блокировал выделение этого комплекса лимфоцитами [32].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА Tag7-Hsp70 С РЕЦЕПТОРОМ TNFR1 ИНДУЦИРУЕТ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Детальное исследование механизмов цитотоксического действия комплекса показало, что в гетерогенной культуре опухолевых клеток разные клетки погибают в разные промежутки времени, и в них индуцируются различные механизмы клеточной гибели. Через 3 ч инкубации с комплексом Tag7-Hsp70 клетки погибали по пути апоптоза, через 20 ч в них

активировались механизмы некроптоза с участием RIP1-киназы [35].

Оба цитолитических процесса индуцировались при взаимодействии Tag7–Hsp70 с одним и тем же клеточным рецептором – TNFR1, специфичным к цитокину TNF-α.

Известно, что TNFR1 принадлежит к семейству рецепторов смерти, он может индуцировать альтернативные цитотоксические процессы программируемой гибели клеток – зависимый от каспаз апоптоз или некроптоз, зависимый от RIP1-киназы [36, 37]. В опухолевых клетках, в которых тем или иным способом подавлена активность каспаз, индуцируются процессы некроптоза [38].

Tag7–Hsp70 связывается с TNFR1 на плазматической мембране опухолевых клеток и взаимодействует с его внеклеточным доменом (sTNFR1) в растворе и на аффинной колонке. Антитела к TNFR1 во всех случаях блокируют этот процесс. Комплекс Tag7–Hsp70 можно рассматривать как новый лиганд рецептора TNFR1, индуцирующий апоптотические и некроптотические процессы в опухолевых клетках [35].

При апоптотической гибели клеток цитотоксическое действие комплекса Tag7–Hsp70 обусловлено последовательной активацией каспазы 8 и каспазы 3. Механизмы внутриклеточного апоптоза с участием митохондрий и каспазы 9 не активировались [35].

Некроптоз начинается с образования некрсомы при участии киназ RIP1 и RIP3. Далее цитотоксический сигнал передается клеточным органеллам – лизосомам и митохондриям. При некроптотической гибели клеток ключевая роль отводится накоплению

активных форм кислорода на мембранах митохондрий. Установлена связь между активацией лизосом и митохондриями. Блокирование каталитической активности вышедших во внутриклеточное пространство лизосомных катепсинов тормозило изменение мембранного потенциала митохондрий и накопление активных форм кислорода [39] (рис. 1).

При этом Tag7 и Hsp70 играют разные роли в индукции цитотоксических процессов. Известно, что активация цитотоксического сигнала – двухстадийный процесс. На первой стадии цитотоксический лиганд связывается с внеклеточным доменом рецептора, на второй стадии изменяется структура внутриклеточного домена TNFR1 с образованием «домена смерти», активирующего внутриклеточные цитотоксические процессы [40].

Необходимым условием образования домена смерти является тримеризация рецептора TNFR1 [40]. Tag7 может связываться с TNFR1 в форме мономера без участия Hsp70, но он не способен вызывать образование тримеров рецептора на клеточной поверхности и, как следствие, индуцировать клеточную гибель. Конкурируя с цитотоксическими лигандами за участок связывания с TNFR1, Tag7 ингибирует цитотоксическое действие как TNF-α, так и комплекса Tag7–Hsp70. Hsp70 не может связываться с TNFR1, но его взаимодействие с Tag7 необходимо для индукции цитотоксичности [35].

С помощью ограниченного трипсинолиза выделен 12-членный пептид, расположенный на С-концевом участке Tag7. Этот пептид способен связываться с рецептором TNFR1 в растворе и на клеточной поверхности [41]. При синтезе этот пептид обозначен

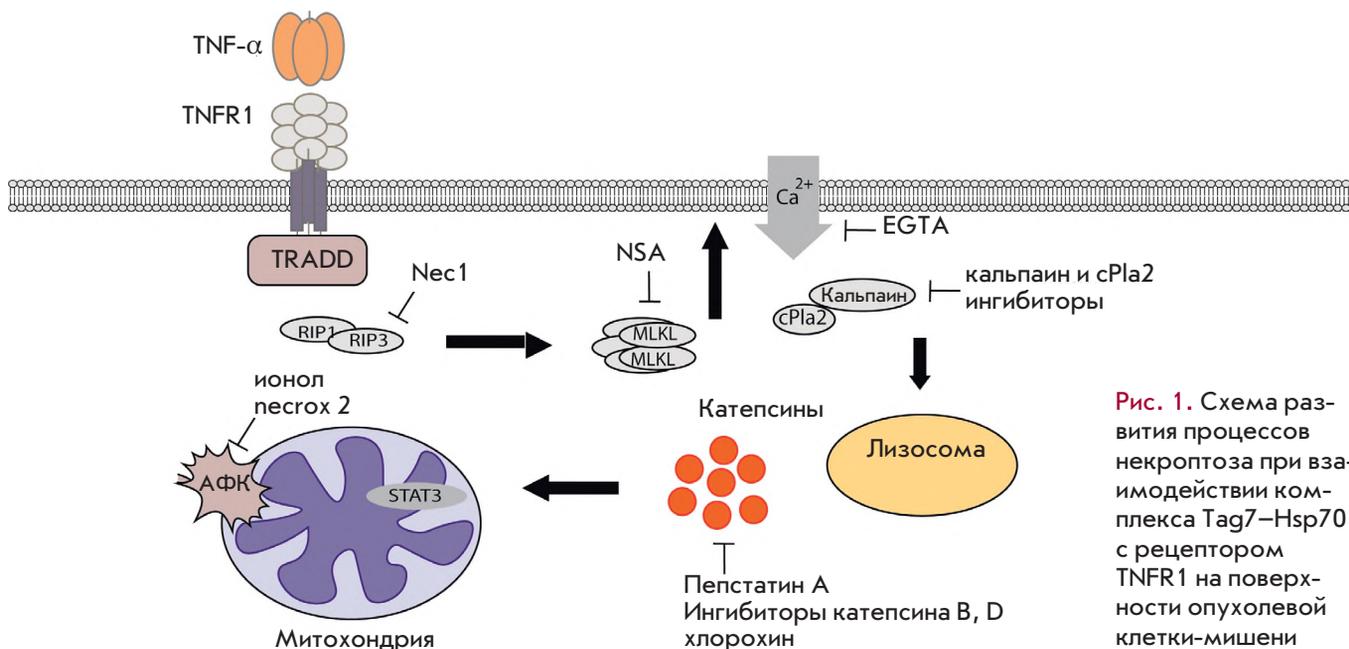


Рис. 1. Схема развития процессов некроптоза при взаимодействии комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором TNFR1 на поверхности опухолевой клетки-мишени

как 17.1. Пептид 17.1, как и полноразмерный Tag7, не индуцировал гибель клеток, но ингибировал цитотоксическую активность и TNF- α , и комплекса Tag7–Hsp70 [41]. Интересно, что этот же пептид способен взаимодействовать с белком теплового шока Hsp70 и образовывать цитотоксический комплекс 17.1–Hsp70, индуцирующий смерть клеток [41].

Пептид 17.1 ингибировал функциональную активность TNF- α не только в клеточной, но и в мышинной модели. Противовоспалительное действие пептида 17.1 изучали на модели аутоиммунного артрита, индуцированного ПАФ (полный адъювант Фрейнда), который стимулирует выделение TNF- α в ткани. Установлено протективное действие этого пептида на хрящевую и костную ткань голеностопного сустава мышей [41]. Можно предположить, что пептид 17.1 окажется перспективным лекарственным соединением, способным блокировать развитие воспалительных процессов.

БЕЛОК МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ Mts1/S100A4 РАЗРУШАЕТ КОМПЛЕКС Tag7–Hsp70

Многие активно метастазирующие линии опухолевых клеток нечувствительны к действию комплекса Tag7–Hsp70. Один из важных белков, стимулирующих метастазирование, – метастазин 1 (Mts1/S100A4), принадлежит к семейству Ca²⁺-связывающих белков S100 [42, 43]. Оказалось, что Mts1 образует стабильные комплексы с Tag7 и Hsp70. Интересно, что Mts1 связывается с тем же участком белка Tag7, что и Hsp70. При взаимодействии Mts1 с комплексом Tag7–Hsp70 происходит диссоциация последнего с образованием комплексов Mts1–Tag7 и Mts1–Hsp70, которые не обладают цитотоксичностью [44]. Таким образом, секреция Mts1 опухолевыми клетками защищает их от токсического действия Tag7–Hsp70 [45].

Действительно, клетки с высоким уровнем Mts1 не являются мишенями для цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70. Как правило, этот комплекс индуцирует цитотоксический сигнал в опухолевых клетках с низким метастатическим потенциалом [45]. Очевидно, это связано с секрецией активно метастазирующими клетками белка Mts1 в высокой концентрации, что приводит к диссоциации цитотоксического комплекса. В этом случае секреция Mts1 представляется одним из путей ускользания опухолевых клеток от действия цитотоксических агентов.

КОМПЛЕКС Tag7–Mts1 ЯВЛЯЕТСЯ ХЕМОКИНОМ

Противоречивые результаты получены при исследовании хемотактической активности Tag7: ученые одной группы утверждали, что Tag7 не способен вызывать хемотаксис лимфоцитов [4], другие обнаружили,

что Tag7, секретированный нейтрофилами, способен индуцировать движение клеток [2]. Как и в случае с цитотоксичностью Tag7, частично правыми были группы.

Сам, Tag7 не обладает хемотактической активностью, но комплекс Tag7–Mts1 вызывает направленное движение NK-клеток, а также CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов по градиенту концентрации этого комплекса [46]. Интересно, что для комплекса Tag7–Mts1 характерен ряд свойств, не присущих классическим хемокинам. Tag7–Mts1 – двухкомпонентный комплекс с высокой молекулярной массой, и ни один из входящих в его состав белков не обладает специфичной для большинства хемокинов структурой «греческий ключ». Тем не менее этот комплекс осуществляет индукцию хемотактического сигнала с помощью хемотактического рецептора CCR5, специфичного для лигандов, обладающих структурой классических хемокинов [47].

Белковые компоненты комплекса Tag7–Mts1, по-видимому, играют различные роли в индукции хемотаксиса. Показано, что Mts1 может связываться с внеклеточным доменом CCR5 и блокировать взаимодействие этого рецептора с лигандами. Однако такого связывания недостаточно для индукции клеточного движения. Tag7 не может взаимодействовать с рецептором CCR5, но, связываясь с Mts1, участвует в трансдукции хемотактического сигнала [47].

Комплекс Tag7–Mts1 может выделяться клетками иммунной системы, которые относятся как к врожденному, так и к приобретенному иммунитету [46]. Интересно, что секреция комплекса Tag7–Mts1 и соответственно индукция направленного движения лимфоцитов осуществляются без предварительной активации иммунокомпетентных клеток. Следовательно, эффекторные лимфоциты начинают движение по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1 до начала иммунного ответа, что обеспечивает быстрое реагирование иммунной системы при попадании в организм патогенов.

Таким образом, Mts1, с одной стороны, разрушает цитотоксический комплекс Tag7–Hsp70, а с другой, образует комплекс Tag7–Mts1, привлекающий к опухоли разные типы Т-лимфоцитов, которые атакуют опухолевые клетки.

Tag7 И Mts1 УЧАСТВУЮТ В АКТИВНОСТИ CD4+ ЛИМФОЦИТОВ НОВОГО ТИПА, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ЛИШЕННЫХ HLA

Tag7 и Mts1 взаимодействуют еще в одном процессе – в убийстве CD4+ лимфоцитами опухолевых клеток, лишенных комплекса HLA.

CD4+ Т лимфоциты – это в основном регуляторные иммунные клетки, которые участвуют в акти-

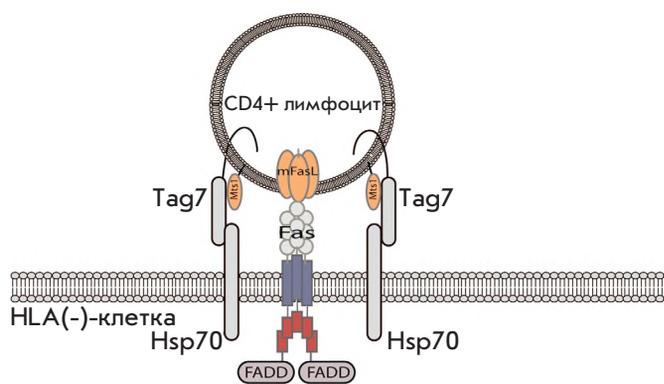


Рис. 2. Tag7 в комплексе с Mts1 участвует в распознавании CD4+ цитотоксическими лимфоцитами HLA-отрицательных опухолевых клеток

вазии эффекторных Т-клеток путем секреции широкого спектра цитокинов [48]. Кроме того, они могут убивать клетки, в том числе и опухолевые, несущие на поверхности белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) типа II. Индукция клеточной смерти осуществляется по классическому пути за счет взаимодействия рецептора TCR с антигенами в комплексе с МНС II и секреции перфорина и гранзимов [48].

Однако недавно выявили еще не описанную субпопуляцию цитотоксических CD4+ Т-лимфоцитов, убивающих опухолевые клетки, на поверхности которых отсутствуют белки МНС I и МНС II, но представлен основной белок теплового шока Hsp70 [49].

Показано, что под действием IL-2 в ЛАК-клетках генерируются, в частности, цитотоксические CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, которые убивают опухолевые клетки HLA⁻ при взаимодействии FasL на поверхности лимфоцита с рецептором Fas клеток-мишеней [50]. Tag7 присутствует на плазматической мембране обеих субпопуляций, но выполняет различные функции.

На цитоплазматической мембране цитотоксических CD4+ Т-лимфоцитов присутствуют не только Tag7 и FasL, но также и Mts1. Mts1 участвует в образовании межклеточного тройного комплекса между Tag7 и Mts1 лимфоцитов и Hsp70, представленным на мембране клеток-мишеней. Mts1 лимфоцитов наряду с Tag7 необходим для проявления цитотоксической активности этими лимфоцитами [44, 45].

Таким образом создается достаточно стабильный межклеточный комплекс Tag7–Mts1–Hsp70, позволяющий цитотоксическому лимфоциту закрепиться на поверхности клетки-мишени. В результате FasL лимфоцита взаимодействует с рецептором Fas клет-

ки-мишени и индуцирует клеточную смерть. И Tag7, и Mts1 абсолютно необходимы для проявления цитотоксичности [44] (рис. 2).

Ни TCR, ни гранзимы не участвуют в цитолизе этих клеток, индукция цитотоксического сигнала осуществляется за счет взаимодействия FasL лимфоцита с рецептором Fas клетки-мишени [49].

На поверхности этих CD4+ Т-лимфоцитов выявлен антиген CD127, что не характерно для регуляторных Т-клеток (Treg) [50].

Важно, что описанная субпопуляция Т-лимфоцитов, несущая на поверхности антигены CD3, CD4, CD25 и CD127 и белки Tag7, Mts1 и FasL, присутствует в крови нормальных доноров и составляет там около 1% Т-лимфоцитов. Возможно, ей принадлежит существенная роль в борьбе с опухолевыми клетками, «сбросившими» в ходе прогрессии комплекс HLA.

CD8+ Т-ЛИМФОЦИТЫ СЕКРЕТИРУЮТ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС Tag7–Hsp70

Известно, что CD8+ Т-лимфоциты, активированные IL-2, способны убивать опухолевые клетки, сбросившие поверхностные антигены в комплексе с МНС II и вышедшие таким образом из-под классического иммунного контроля. Взаимодействие CD8+ Т-лимфоцитов с такими опухолевыми клетками осуществляется за счет связывания рецептора NKG2D лимфоцитов с неканонической молекулой МНС – MicA – на опухолевой клетке. Активированные IL-2 CD8+ Т-лимфоциты образуют межклеточный комплекс NKG2D–MicA [51]. Хотя на мембране этих лимфоцитов присутствует Tag7, а на мембране исследуемых опухолевых клеток экспрессированы и MicA, и Hsp70, комплекс Tag7–Hsp70 между CD8+ Т лимфоцитами и клетками-мишенями не образуется. Вероятно, это связано с отсутствием на мембране лимфоцита Mts1 (см. выше).

Взаимодействие NKG2D с MicA обеспечивает две функции цитотоксических лимфоцитов. Это, во-первых, индукция цитотоксического сигнала с последующей гибелью опухолевых клеток-мишеней благодаря связыванию FasL лимфоцита с рецептором Fas опухолевой клетки. Во-вторых, секреция в зону контакта клеток растворимого цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70 [52]. Предполагается, что связывание рецептора Fas с FasL на поверхности лимфоцита индуцирует накопление комплекса Tag7–Hsp70 во внутриклеточных мембранах лимфоцитов. Для секреции этого комплекса необходимо дополнительное связывание MicA на поверхности клетки-мишени с NKG2D на поверхности лимфоцита, предположительно для создания межклеточной контактной зоны [52] (рис. 3).

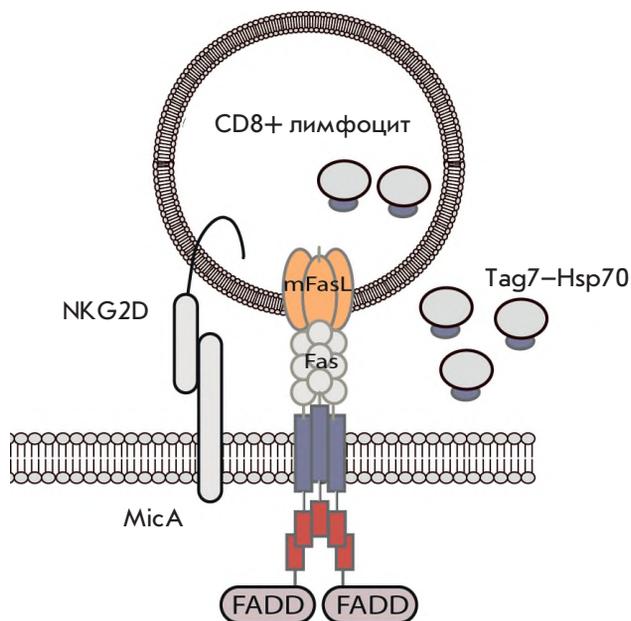


Рис. 3. Схема распознавания и убийства HLA-отрицательной опухолевой клетки CD8+ цитотоксическим лимфоцитом. Контакт с опухолевой клеткой-мишенью приводит к секреции цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70

КОШАПЕРОН HspBP1 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА Tag7-Hsp70

Установлено, что кошаперон HspBP1 – ингибитор АТФ-азной активности Hsp70, также может связываться с Tag7 и подавлять цитотоксическую активность комплекса Tag7-Hsp70 [53]. Возможны разные механизмы, приводящие к этому эффекту. Так HspBP1 может связываться с Tag7 и Hsp70 в тройной комплекс с последующей необратимой агрегацией и образованием крупных конгломератов, лишенных цитотоксической активности. Кроме того, HspBP1 может конкурентно вытеснять Hsp70 из комплекса Tag7-Hsp70. Образованный в результате такого замещения комплекс Tag7-HspBP1 не оказывал цитотоксического действия на опухолевые клетки. Этот комплекс довольно стабилен, он обнаружен в кондиционных средах некоторых опухолевых клеток и сыворотке человека [54]. В присутствии Hsp70 в высокой концентрации Tag7-HspBP1 диссоциирует с образованием цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70 [53].

Интересно, что цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты секретируют Tag7-Hsp70 одновременно с его ингибитором HspBP1, в связи с чем цитотоксическая активность этого комплекса сохраняется не более 30 ч. Добавление антител к HspBP1 при хранении секретированного комплекса Tag7-Hsp70 предотвращало его инактивацию [53].

Таким образом, ингибитор присутствует в тех же лимфоцитах, которые содержат комплекс Tag7-Hsp70, и секретируется с использованием тех же механизмов. Для индукции его секреции также требуется образование контактной зоны между лимфоцитом и клеткой-мишенью [53].

PGLYRP1/Tag7 СВЯЗЫВАЕТСЯ С РЕЦЕПТОРОМ TREM1 И ИНДУЦИРУЕТ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Недавно было установлено, что Tag7 является лигандом рецептора врожденного иммунитета TREM1, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на моноцитах и нейтрофилах [55]. Предполагается, что TREM1 вовлечен в активацию моноцитов и провоспалительный иммунный ответ [56]. Взаимодействие Tag7 с TREM1 приводит к активации генов провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1β) и секреции их продуктов [55, 57]. Скорее всего, это один из путей участия Tag7 в антибактериальной защите у млекопитающих, связанный с секрецией этих цитокинов.

Оказалось, однако, что активация лимфоцитов с последующей секрецией цитокинов, наблюдаемая при взаимодействии Tag7 с TREM1, не ограничивается стимулированием механизмов только антибактериальной защиты. Сигнал активации, индуцированный белком врожденного иммунитета Tag7, передается регуляторным и эффекторным лимфоцитам, принадлежащим к адаптивному иммунитету, и способствует формированию субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, убивающих вышедшие из-под иммунного контроля опухолевые и инфицированные вирусом клетки [57]. Как и в случае лимфоцитов, активированных под действием IL-2, активированные Tag7 CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты узнавали на поверхности клеток-мишеней стрессовые белки (Hsp70 или неканонические молекулы HLA, MicA) и убивали эти клетки через взаимодействие FasL-Fas по пути апоптоза или некроптоза.

Показано также, что низкомолекулярный активатор иммунитета Тилорон способен вызывать появление точно таких же цитотоксических лимфоцитов, что указывает на общий механизм образования подобных цитотоксических популяций [58].

Tag7 И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Приведенные данные позволили предположить, что Tag7 является перспективным агентом для лечения онкологических заболеваний. На самом деле такие исследования были начаты раньше. Уже в первых работах по изучению функций белка Tag7 оценили его влияние на рост перевиваемых опухолей VMR-0 у мышей [59, 60]. Эти клетки, как и по-

давяющее большинство опухолей, не синтезируют Tag7. Клетки трансфицировали генетическими конструкциями, обеспечивающими умеренный синтез Tag7, так как более активный его синтез убивает клетки.

Контрольные опухоли VMR-0 росли быстро и убивали мышей примерно через месяц. Опухоли, синтезирующие Tag7, росли гораздо медленнее и по прошествии нескольких месяцев вообще исчезали. Далее мышам вводили смесь контрольных и трансфицированных клеток. Рост этих опухолей был промежуточным между ростом опухолей из контрольных и трансфицированных клеток, но по истечении нескольких месяцев опухоли опять-таки исчезали. Интересно, что опухоли, продуцирующие Tag7, подвергались сильной инфильтрации NK-клетками в отличие от контрольных опухолей.

Учитывая эти результаты, в Онкологическом центре им. Н.Н. Блохина (Москва) и в Онкологическом институте им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) проведена 1-я фаза клинических испытаний аутологичных вакцин на основе гена *tag7* [61, 62]. Испытания проводили на больных с меланомой или раком почек IV стадии, к которым уже были безуспешно применены все обязательные методы терапии. Из операционного материала получали культуры клеток. Их трансфицировали конструкцией с геном *tag7* человека, обеспечивающей синтез белка Tag7 клетками. Клетки после их инактивации рентгеновским облучением вводили подкожно тому же больному, от которого взята опухоль. Показана как полная безопасность применения вакцины, так и определенный положительный эффект в 20–25% случаев, который заключался в стабилизации роста опухоли или в ее частичном регрессе вплоть до полной редукции крупных метастазов.

В Онкологическом институте им. Н.Н. Петрова проведена и 2-я фаза клинических испытаний таких вакцин на 80 больных с теми же типами опухолей [63]. Число инъекций вакцин было увеличено (вплоть до 26). Часть больных не реагировала на терапию. С остальными контакт был утрачен через разные промежутки времени по причинам, не связанным с заболеванием. Учитывались только те больные, связь с которыми сохранялась до 5 лет. Из этих 74 пациентов 12 прожили более 5 лет: контакт с ними был утрачен через 5–15 лет, причем к моменту его потери у пациентов отсутствовали признаки прогрессии опухоли. Из *таблицы* видно, что судьбу некоторых пациентов удалось проследить вплоть до 15 лет. К сожалению, эти результаты не были формально засчитаны, поскольку испытания проводились по старым правилам, где доклинические исследования выполняла лаборатория-разработчик, а вакци-

ны готовили не в специальном сертифицированном учреждении, а в лаборатории или клинике.

Практическое излечение 16% безнадежных больных представляет определенный интерес, тем более что можно предполагать причины неудачи в других случаях. По-видимому, один из важнейших факторов в описанном методе терапии – привлечение к опухоли разных типов Т-лимфоцитов. С другой стороны, известен целый ряд механизмов, с помощью которых опухолевые клетки становятся неузнаваемыми для защитных Т-лимфоцитов [64]. Один из важных механизмов – это синтез опухолевыми клетками DP-L1, лиганда рецептора DP1 [64]. Показано, что антитела к DP-L1 или DP1 вызывают сильный терапевтический эффект у больных меланомой и рядом других опухолей за счет нарушения взаимодействия DP-L1–DP1 [64]. Известно уже несколько коммерческих лекарств этого типа. От совместного применения двух технологий можно ожидать сильный синергический эффект, так как каждая из них дополняет другую.

Важно также осуществить переход от аутологичных вакцин к аллогенным, что гораздо более технологично. Такой переход требует выполнения ряда генно-технологических операций. Работа в этом направлении ведется.

Таким образом, из 74 пациентов, судьба которых прослежена в течение 5 лет и более (время последнего контакта), 12 (16.2%) были живы и не имели признаков прогрессии опухоли при последнем контакте более чем через 5 лет, из них 9 через 7 лет и 3 – че-

Терапевтический эффект Tag7

Стадия опухоли	Последний контакт (лет после терапии)	Прогрессия опухоли	Исходный возраст
МЕЛАНОМА (63)			
3	15.4	Не было	33
3	15.2	То же	39
4	14.9	«-»	40
3	12.1	«-»	67
4	8.9	«-»	56
4	8.8	«-»	65
3	8.6	«-»	59
4	7.1	«-»	62
3	6.9	«-»	41
3	5.3	«-»	35
РАК ПОЧКИ (11)			
4	9.9	Не было. Умер через 10 лет по другой причине	58
4	5.2	Не было	65

рез 15 лет. Контакты были прерваны по причинам, не связанным с заболеванием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует подчеркнуть, что PGLYRP1/Tag7 занимает важное место среди белков-регуляторов, ключевых для развития иммунных реакций. PGLYRP1/Tag7 классифицирован как белок врожденного иммунитета, но может участвовать в регуляции иммунных механизмов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Под действием Tag7 индуцируются механизмы антибактериальной защиты, а также формирование субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, убивающих вышедшие из-под иммунного контроля клетки в противоопухолевом иммунитете. Под действием комплекса Tag7-Hsp70 умирают опухолевые клетки, несущие рецептор TNFR1.

Исследование кристаллической структуры Tag7 выявило существование в его молекуле сайта белок-белкового взаимодействия. Очевидно, что Tag7 может взаимодействовать с различными белками, и это взаимодействие обуславливает различную функциональную активность этого белка. В настоящее время способность белков изменять свою функцию после взаимодействия с другими белками и образования стабильных комплексов хорошо известна, как «совместительство» [65].

Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что Tag7 может связываться с пятью белками: TREM1, TNFR1, Hsp70, HspBP1, Mts1, причем два из них являются рецепторами, представленными на цитоплазматической мембране иммунных и опухолевых клеток и участвующими в индукции механизмов иммунного ответа. Взаимодействие Tag7 с этими белками приводит к развитию врожденных и адаптивных реакций, участвующих в защите организма от патогенов (рис. 4).

Антибактериальное действие Tag7 у насекомых связано с активацией каскада сериновых протеаз, которые переводят лиганд Toll-рецептора Spatzle в активную форму с последующим выделением антимикробных пептидов. У млекопитающих антибактериальная активность PGRP связана с тремя цитотоксическими механизмами: индукцией окислительного, тиолового и металлического стресса. При этом PGRP также функционирует в кооперации с другими механизмами иммунной защиты и антибактериальными пептидами.

Взаимодействие Tag7 с рецептором врожденного иммунитета TREM1 человека на ранней стадии активации моноцитов приводит к секреции провоспалительных цитокинов, индуцируя один из путей антибактериальной защиты. Дальнейшая передача

сигнала активации к регуляторным клеткам приводит к активации субпопуляций цитотоксических лимфоцитов, элиминирующих опухолевые и вирус-содержащие клетки, утратившие поверхностные антигены HLA.

Эти лимфоциты могут убивать опухолевые клетки, используя как контактный механизм лизиса за счет взаимодействия FasL-Fas, так и секреторный – за счет выделения в зону контакта цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70.

Цитотоксическое действие комплекса Tag7-Hsp70 контролируется с помощью секреции кошаперона HspBP1. HspBP1 выделяется лимфоцитами одновременно с цитотоксическим комплексом и может ингибировать его активность за счет неупорядоченной агрегации тройного комплекса Tag7-Hsp70-HspBP1 или диссоциации комплекса Tag7-Hsp70.

Отдельно взятый Tag7, связываясь с внеклеточным доменом рецептора, блокирует трансдукцию цитотоксического сигнала в опухолевые клетки. Он не только не вызывает клеточную гибель, но и ингибирует цитотоксическое действие других лигандов TNFR1, главным образом активность TNF- α . Для индукции цитолиза под действием Tag7 необходим Hsp70 и образование цитотоксического комплекса на клеточной поверхности. В этой связи интересным представляется обнаружение пептидного фрагмента Tag7, модулирующего его функции. Расширение спектра таких функциональных пептидов может оказаться актуальным при разработке подходов к созданию лекарственных соединений, блокирующих развитие острых воспалительных процессов.

Участие Tag7 в иммунном ответе не ограничивается активацией цитотоксических лимфоцитов и проявлением цитотоксического действия на опухолевые клетки в комплексе с Hsp70. Показано, что Tag7 также может взаимодействовать с белком Mts1 (S100A4), обнаруженным у широкого спектра метастазирующих опухолей. Растворимый Mts1 конкурирует с Hsp70 за связывание с Tag7, вытесняя его из цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70 с образованием неактивного комплекса Tag7-Mts1. Однако комплекс Tag7-Mts1 обладает хемотактической активностью и индуцирует направленное движение по градиенту концентрации этого комплекса эффекторных лимфоцитов и врожденного, и приобретенного иммунитета.

Комплекс Tag7-Mts1 секретируется клетками иммунной системы, главным образом нейтрофилами и моноцитами, без предварительной активации, что может обеспечивать быстрое развитие иммунных реакций после попадания в организм патогенов.

В опытах на мышах на ряде опухолевых линий показано, что инъекция опухолевых клеток, транс-

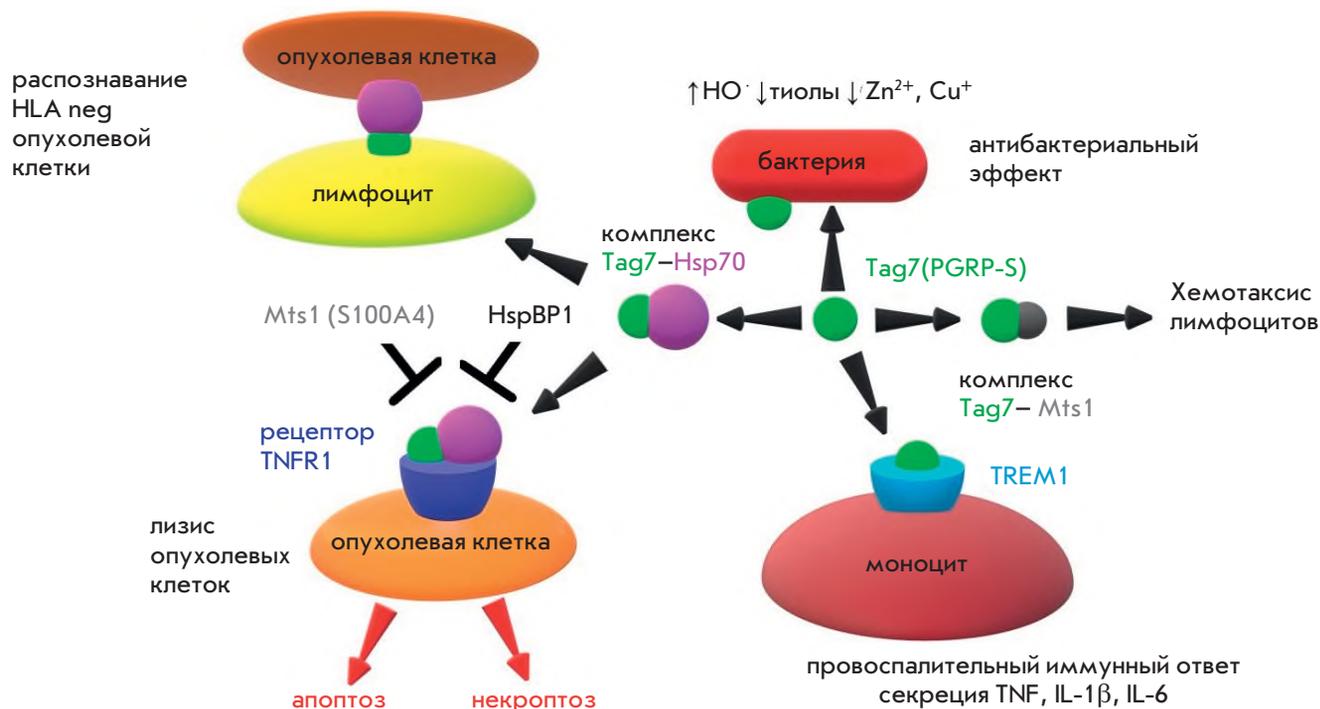


Рис. 4. Функции белка PGLYRP1 / Tag7

фицированных конструкцией, продуцирующей Tag7, подавляет рост перевитой опухоли той же линии. На основе этих данных созданы аутологичные вакцины, прошедшие первую и вторую фазы клинических испытаний на безнадежных пациентах с меланомой и раком почек. В 12 из 74 случаев получено практическое излечение. Существует ряд воз-

можностей существенно увеличить эффективность терапии.

Суммируя вышесказанное, можно видеть, что Tag7 – многофункциональный белок, участвующий в регуляции различных этапов иммунного ответа и имеющий перспективы практического использования в онкологии. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kustikova O.S., Kiselev S.L., Borodulina O.R., Senin V.M., Afanas'eva A.V., Kabishev A.A. // *Genetika*. 1996. V. 32. № 5. P. 621–628.
- Kiselev S.L., Kustikova O.S., Korobko E.V., Prokhortchouk E.B., Kabishev A.A., Lukanidin E.M., Georgiev G.P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 29. P. 18633–18639.
- Kang D., Liu G., Lundström A., Gelius E., Steiner H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 17. P. 10078–10082.
- Liu C., Gelius E., Liu G., Steiner H., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 32. P. 24490–24499.
- Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 25. P. 13772–13777.
- Liu C., Xu Z., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 37. P. 34686–34694.
- Kibardin A.V., Mirkina I.I., Baranova E.V., Zakeyeva I.R., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. № 2. P. 467–474.
- Lu X., Wang M., Qi J., Wang H., Li X., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5895–5907.
- Mirkina I.I., Kiselev S.L., Sashchenko L.P., Sadchikova E.R., Gnuchev N.V. // *Dokl. Akad. Nauk*. 1999. V. 367. № 4. P. 548–552.
- Kim M.S., Byun M., Oh B.H. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 8. P. 787–793.
- Hultmark D. // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. № 1. P. 12–19.
- Söderhäll K., Cerenius L. // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. V. 10. № 1. P. 23–28.
- Gottar M., Gobert V., Michel T., Belvin M., Duyk G., Hoffmann J.A., Ferrandon D., Royet J. // *Nature*. 2002. V. 416. № 6881. P. 640–644.
- Wang L., Weber A.N., Atilano M.L., Filipe S.R., Gay N.J., Ligoxygakis P. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 20. P. 5005–5014.
- Khush R.S., Leulier F., Lemaitre B. // *Trends Immunol.* 2001. V. 22. № 5. P. 260–264.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. // *Science*. 1999. V. 284. № 5418. P. 1313–1318.
- Takehana A., Katsuyama T., Yano T., Oshima Y., Takada H., Aigaki T., Kurata S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 21. P. 13705–13710.
- Dziarski R., Park S.Y., Kashyap D.R., Dowd S.E., Gupta D. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 1. e0146162.
- Royet J., Dziarski R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 4. P. 264–277.
- Lu X., Wang M., Qi J., Wang H., Li X., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 9. P. 5895–5907.

21. Tydell C.C., Yount N., Tran D., Yuan J., Selsted M.E. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 22. P. 19658–19664.
22. Tydell C.C., Yuan J., Tran P., Selsted M.E. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 2. P. 1154–1162.
23. Li X., Wang S., Qi J., Echtenkamp S.F., Chatterjee R., Wang M., Boons G.J., Dziarski R., Gupta D. // *Immunity.* 2007. V. 27. № 3. P. 518–529.
24. Gelius E., Persson C., Karlsson J., Steiner H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 306. № 4. P. 988–994.
25. Wang Z.M., Li X., Cocklin R.R., Wang M., Wang M., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Gupta D., Dziarski R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 49. P. 49044–49052.
26. Sharma P., Dube D., Sinha M., Mishra B., Dey S., Mal G., Pathak K.M., Kaur P., Sharma S., Singh T.P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 36. P. 31723–31730.
27. Kashyap D.R., Rompca A., Gaballa A., Helmann J.D., Chan J., Chang C.J., Hozo I., Gupta D., Dziarski R. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 7. e1004280.
28. Kashyap D.R., Kuzma M., Kowalczyk D.A., Gupta D., Dziarski R. // *Mol. Microbiol.* 2017. V. 105. № 5. P. 755–776.
29. Chandrangsu P., Rensing C., Helmann J.D. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. V. 15. № 6. P. 338–350.
30. German N., Doyscher D., Rensing C. // *Future Microbiol.* 2013. V. 8. № 10. P. 1257–1264.
31. Cho J.H., Fraser I.P., Fukase K., Kusumoto S., Fujimoto Y., Stahl G.L., Ezekowitz R.A. // *Blood.* 2005. V. 106. № 7. P. 2551–2558.
32. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 3. P. 2117–2124.
33. Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // *Cell Stress Chaperones.* 2001. V. 6. № 4. P. 337–344.
34. Dukhanina E.A., Yashin D.V., Lukjanova T.I., Romanova E.A., Kabanova O.D., Shatalov Y.V., Sashchenko L.P., Gnuchev N.V. // *Dokl. Biol. Sci.* 2007. V. 414. P. 246–248.
35. Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkova A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 35. P. 21724–21731.
36. Christofferson D.E., Yuan J. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. V. 22. № 2. P. 263–268.
37. Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B., Tschoep J. // *Nat. Immunol.* 2000. V. 1. № 6. P. 489–495.
38. Nagata S. // *Cell.* 1997. V. 88. № 3. P. 355–365.
39. Yashin D.V., Romanova E.A., Ivanova O.K., Sashchenko L.P. // *Biochimie.* 2016. V. 123. P. 32–36.
40. Wingfield P., Pain R.H., Craig S. // *FEBS Lett.* 1987. V. 211. № 2. P. 179–184.
41. Romanova E.A., Sharapova T.N., Telegin G.B., Minakov A.N., Chernov A.S., Ivanova O.K., Bychkov M.L., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *Cells.* 2020. V. 9. № 2. P. 488.
42. Ebralidze A., Tulchinsky E., Grigorian M., Afanasyeva A., Senin V., Revazova E., Lukanidin E. // *Genes Dev.* 1989. V. 3. № 7. P. 1086–1093.
43. Kriajevska M.V., Cardenas M.N., Grigorian M.S., Ambartsumian N.S., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 31. P. 19679–19682.
44. Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Lukyanova T.I., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Romanova E.A., Gnuchev N.V., Galkin A.V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 33. P. 13963–13967.
45. Dukhanina E.A., Yashin D.V., Galkin A.V., Sashchenko L.P. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 4. P. 676–682.
46. Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., Guerriero V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Yashin D.V., Sashchenko L.P. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
47. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 4. P. 115–120.
48. Appay V., Zaunders J.J., Papagno L., Sutton J., Jaramillo A., Waters A., Easterbrook P., Grey P., Smith D., McMichael A.J., et al. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. № 11. P. 5954–5958.
49. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Romanova E.A., Khaidukov S.V., Galkin A.V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // *Blood.* 2007. V. 110. № 6. P. 1997–2004.
50. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Immunol. Res.* 2018. V. 2018. P. 4501273.
51. Ivanova O.K., Sharapova T.N., Romanova E.A., Soshnikova N.V., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Cell. Biochem.* 2017. V. 118. № 10. P. 3359–3366.
52. Sashchenko L.P., Romanova E.A., Ivanova O.K., Sharapova T.N., Yashin D.V. // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 1. P. 30–36.
53. Yashin D.V., Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Romanova E.A., Lukyanova T.I., Tonevitskii A.G., Raynes D.A., Gnuchev N.V., Guerriero V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 12. P. 10258–10264.
54. Yashin D.V., Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Romanova E.A., Lukyanova T.I., Tonevitskii A.G., Belogurov A.A., Raynes D.A., Sheludchenkova A.A., Gnuchev N.V., et al. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 1. P. 203–206.
55. Read C.B., Kuijper J.L., Hjorth S.A., Heipel M.D., Tang X., Fleetwood A.J., Dantzer J.L., Grell S.N., Kastrup J., Wang C., et al. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 4. P. 1417–1421.
56. Gibot S., Kolopp-Sarda M.N., Béné M.C., Bollaert P.E., Lozniewski A., Mory F., Levy B., Faure G.C. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. № 11. P. 1419–1426.
57. Sharapova T.N., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *J. Innate Immun.* 2017. V. 9. № 6. P. 598–608.
58. Sharapova T.N., Romanova E.A., Sashchenko L.P., Yashin D.V. // *IUBMB Life.* 2019. V. 71. № 3. P. 376–384.
59. Larin S.S., Korobko E.V., Kustikova O.S., Borodulina O.R., Raikhlin N.T., Brisgalov I.P., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. № 7. P. 798–808.
60. Kiselev S.L., Larin S.S., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // *Genetika.* 2000. V. 36. № 11. P. 1431–1435.
61. Moiseenko V.M., Danilov A.O., Baldueva I.A., Danilova A.B., Tiukavina N.V., Larin S.S., Kiselev S.L., Orlova R.V., Semenova A.I., Turkevich E.A., et al. // *Vopr. Onkol.* 2004. V. 50. № 3. P. 293–303.
62. Moiseyenko V.M., Danilov A.O., Baldueva I.A., Danilova A.B., Tyukavina N.V., Larin S.S., Kiselev S.L., Orlova R.V., Anisimov V.V., Semenova A.I., et al. // *Ann. Oncol.* 2005. V. 16. № 1. P. 162–168.
63. Novik A.V., Danilova A.B., Sluzhev M.I., Nehaeva T.L., Larin S.S., Girdyuk D.V., Protsenko S.A., Semenova A.I., Danilov A.O., Moiseyenko V.M., et al. // *Oncologist.* 2020. doi: 10.1634/theoncologist.2020-0160. Online ahead of print.
64. Ingram J.R., Blomberg O.S., Rashidian M., Ali L., Garforth S., Fedorov E., Fedorov A.A., Bonanno J.B., Gall C.L., Crowley S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 15. P. 3912–3917.
65. Jeffery C.J. // *Protein Sci.* 2019. V. 28. № 7. P. 1233–1238.

УДК 571.27

COVID-19 в России: клинические и иммунологические особенности пациентов первой волны

Т. В. Бобик¹, Н. Н. Костин¹, Г. А. Скрябин¹, П. Н. Цабай¹, М. А. Симонова¹, В. Д. Кнорре^{1*}, О. Н. Стратиенко², Н. Л. Алешенко², И. И. Воробьев¹, Е. Н. Хурс³, Ю. А. Мокрушина¹, И. В. Смирнов¹, А. И. Алехин², А. Э. Никитин², А. Г. Габибов¹

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

²Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: vera.knorre@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2020

Принята к печати 16.02.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11374

РЕФЕРАТ Пандемия, вызванная распространением SARS-CoV-2, стала причиной более 2 млн летальных исходов, поразила более 100 млн человек на всех континентах. Россия не стала исключением, и отечественное здравоохранение мобилизовало значительные ресурсы для борьбы с инфекцией. В работе проанализированы результаты функционального анализа 155 пациентов Московского региона, проходивших обследование в Центральной клинической больнице Российской академии наук в период первой волны пандемии (февраль–июль 2020 года). Критерием включения стал положительный ПЦР-тест и наличие типичной рентгенологической картины вирусной пневмонии в виде «матового стекла» при компьютерно-томографическом исследовании. Клинический корреляционный анализ проводили по четырем группам пациентов: не находившихся на ИВЛ (1), находившихся на ИВЛ (2) и тех из них, кто впоследствии выздоровел (3) или скончался (4). Учитывали также отягощающие патологии (сахарный диабет, метаболические синдромы, гипертоническая болезнь и другие нозологии). Иммунологический статус пациентов (уровень иммуноглобулинов классов М, А, G и их подклассов, а также тотальный ответ иммуноглобулинов) определяли с использованием оригинального набора для ИФА, включающего в качестве антигенов фрагменты RBD-SD1 и NTD S-белка, а также N-белок, полученные в прокариотической системе из клеток *Escherichia coli*. В качестве антигена, представляющего конформационные эпитопы RBD, использовали рекомбинантный RBD (RBD CHO), полученный в эукариотической системе из клеток CHO. Установлено, что уровень иммуноглобулина А является самым ранним серологическим критерием развития инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, и обуславливает лучшие показатели чувствительности и диагностической значимости ИФА по сравнению с уровнем иммуноглобулина класса М. Показано, что скорость сероконверсии «ранних» М и А антител, специфичных к N-белку, сравнима со скоростью сероконверсии антител, специфичных к конформационным эпитопам RBD. В то же время сероконверсия иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку вируса SARS-CoV-2, значительно опережает этот показатель для антител другой специфичности. Согласно полученным данным, сильную иммуногенность RBD-фрагмента в большей степени обеспечивают конформационные эпитопы, в то время как линейные эпитопы RBD и NTD обладают наименьшей иммуногенностью. Анализ частот встречаемости SARS-CoV-2-специфичных иммуноглобулинов разных классов позволил установить необходимость одновременного определения RBD- и N-специфичных антител для увеличения чувствительности ИФА. Анализ распределения содержания подклассов иммуноглобулинов в сыворотках крови серопозитивных индивидов выявил равномерную индукцию специфичных к N-белку подклассов G1–G4 иммуноглобулина G и A1–A2 иммуноглобулина А в группах с различной степенью тяжести COVID-19. В случае S-антигенов основными подклассами антител при иммунном ответе являются G1, G3 и A1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА серологический анализ больных COVID-19, SARS-CoV-2-специфичные подклассы антител. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИФА – иммуноферментный анализ; COVID-19 – коронавирусная болезнь 2019; NTD – N-концевой домен; RBD – рецепторсвязывающий домен; RBD-SD1 – рецепторсвязывающий домен-субдомен 1; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия, официально объявленная ВОЗ 11 марта 2020 года в связи с распространением новой коронавирусной инфекции (coronavirus disease 2019, COVID-19), стала вызовом для мирового медицинского и научного сообщества. К февралю 2021 года в мире коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) заразились более 100 млн человек и более 2 млн из них скончались. Инфекция довольно быстро распространилась и в регионах России. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации на 10 февраля, в стране заболевание перенесли в общей сложности более 4 млн человек, из которых более 80000 с летальным исходом.

Новый коронавирус SARS-CoV-2, принадлежащий к роду *Betacoronavirus*, – цитопатический вирус, содержащий одноцепочечную РНК, отнесенный ко II группе патогенности. Этот вирус инфицирует клетки, несущие на своей поверхности рецепторы ангиотензинпревращающего фермента типа II (ACE2), главным образом альвеолярные пневмоциты типа II и в меньшей степени другие эпителиальные клетки [1]. Инфицирование коронавирусом SARS-CoV-2 приводит к широкому спектру проявлений – от бессимптомного течения до тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заканчивающегося смертельным исходом. Согласно статистическому анализу, примерно у 80% пациентов заболевание протекает в легкой, не требующей госпитализации форме, с клиническими признаками острого инфекционного заболевания дыхательных путей с типичными катаральными симптомами и в большинстве случаев завершается спонтанным выздоровлением. Течение заболевания обычно напоминает ОРВИ, вызванные вирусами гриппа типа А и В, риновирусами, аденовирусами, сезонными коронавирусами, однако в ряде случаев инфицирование вирусом SARS-CoV-2 может приводить к очень быстрому формированию острого воспаления с развитием тяжелой двухсторонней пневмонии, геморрагической лихорадки и дисфункции органов. Течение заболевания по драматическому сценарию сопровождается развитием тяжелой пневмонии и наблюдается у 15% больных, а у примерно 5% пациентов развивается ОРДС и полиорганная недостаточность. Частота смертельных исходов различается в разных странах и колеблется по последним данным в диапазоне 1.04–8.5% подтвержденных случаев заболевания. За последний год предпринято множество попыток найти взаимосвязь между различными факторами (такими, как пол, возраст, раса, сопутствующие заболевания, различные индикаторы и маркеры

(включая генетические) и т.д.) и тяжестью заболевания [2–8].

Однако, несмотря на большой массив данных, накопленных за это время, большинство найденных корреляций остаются противоречивыми. В большинстве публикаций генетическую предрасположенность к развитию осложнений связывают со структурными особенностями ACE2, системы презентации антигена и генов, ответственных за систему врожденного иммунитета [9].

Гуморальные реакции служили основными маркерами тяжести заболевания при других вирусных инфекциях легких, включая инфекции SARS-CoV и вируса гриппа [10–13].

Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре структурных белка – шиповидный (S-белок), нуклеокапсидный (N-белок), белок оболочки (E) и мембранный белок (M) [14]. Белки S и N являются двумя основными антигенами коронавируса, которые индуцируют выработку иммуноглобулинов [15]. Антитела к N-белку часто индуцируются в относительно более высоком количестве, чем другие белки, которые служат основной мишенью для серологической диагностики [15, 16].

Рецепторсвязывающий домен (RBD), присутствующий в области S1 белка S, является основной мишенью нейтрализующих антител (NAbs), а также применяется при конструировании вакцин [17–20].

Согласно приведенным данным (статистика ВОЗ), частота летальных исходов в России (1.89%) остается одной из самых низких в мире. Этот феномен еще требует детального исследования. Безусловно, определенную роль в этом могут играть факторы, связанные с организацией здравоохранения в Российской Федерации, однако есть все основания полагать, что объяснение феномена будет связано с демографическими факторами, факторами, связанными с группами риска и маркерами тяжести воспаления. Представляло интерес подробно охарактеризовать гуморальные реакции адаптивного иммунитета когорт пациентов российской популяции в ответ на коронавирусную инфекцию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Материалы**

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

Получение рекомбинантных белков, фрагментов S- и N-белков вируса SARS-CoV-2

Искусственно синтезированные фрагменты ДНК, кодирующие фрагменты RBD (330–538 а.о.),

RBD-SD1 (330–590 а.о.) и NTD (17–305 а.о.) S-белка и последовательность N-белка (1–420 а.о.) вируса SARS-CoV-2, были клонированы в плазмиды рET22b с использованием эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI. Корректность полученных конструкций подтверждали секвенированием.

Клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированные полученными генетическими конструкциями, культивировали в среде 2YT с ампициллином при 37°C и интенсивном перемешивании до достижения $ОП_{600} = 0.4$ о.е., после чего проводили индукцию 1 мМ IPTG и культивировали в течение 6 ч при 30°C. Выделение и очистку рекомбинантных белков из телец включения проводили с использованием металл-хелатной хроматографии (HisTrap FF, GE Healthcare, США) в денатурирующих условиях.

Экспрессию и очистку рекомбинантного RBD (320–537 а.о.), полученного в эукариотической системе клеток CHO, проводили по ранее описанной методике [21].

Проведение ИФА

Сорбцию очищенных рекомбинантных RBD, RBD-SD1, NTD и N-белка, полученных в прокариотической системе *E. coli*, в лунки планшета проводили в буфере, содержащем 50 мМ гидрокарбоната натрия, 4 М мочевины, pH 10.6. Для детекции специфичных к SARS-CoV-2 антител в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов Nunc MaxiSorp (Nunc, США) вносили смесь антигенов RBD-SD1, NTD и N в соотношении 40/20/40 нг на лунку или каждый полученный антиген (100 нг) и инкубировали при 4°C в течение 16 ч без перемешивания. По окончании инкубации удаляли раствор из лунок, промывали их дистиллированной водой и вносили блокирующий раствор (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20, 3% БСА). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре без перемешивания. По окончании инкубации удаляли блокирующий раствор, высушивали досуха при комнатной температуре и хранили при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

В опытах с биологическими образцами сыворотки разводили в соотношении 1 : 100 (для анализа суммарных иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку) или 1 : 10 (во всех остальных случаях) в промывочном растворе (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20), вносили в лунку и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин). Планшеты промывали 5 раз промывочным раствором, добавляли антитела к соответствующим классам и подклассам антител человека в растворе для разведения конъюгатов (фосфатно-солевой буфер, 0.1% Tween 20,

0.1% БСА) и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин) [22]. После пятикратной промывки планшетов промывочным раствором добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в растворе для разведения конъюгатов и инкубировали при 37°C и перемешивании (700 об/мин, 30 мин). После промывки планшетов промывочным раствором (5 раз) добавляли субстрат ТМБ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Реакцию останавливали 10% раствором фосфорной кислоты, измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Для корректной интерпретации результатов ИФА рассчитывали пороговое значение ОПкрит на основании значений ОП используемой панели сывороток здоровых доноров (ОП-ср), используя среднее значение оптической плотности в данных лунках по формуле:

$$\text{ОПкрит} = \text{ОП-ср} + 3 \times \text{стандартных отклонения.}$$

На основании полученного значения ОПкрит рассчитывали индекс позитивности для каждого исследуемого образца по формуле:

$$\text{ИПобр} = \text{ОПобр} / \text{ОПкрит.}$$

При ИПобр ≥ 1 образец сыворотки крови считали положительным (образец содержит антитела, специфичные к коронавирусу SARS-CoV-2), при ИПобр < 0.9 образец сыворотки крови считали отрицательным.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование базируется на клиническом материале, собранном в Центральной клинической больнице Российской академии наук в период апрель–май 2020 года. В общей сложности обследовано 155 пациентов с диагнозом COVID-19. Критериями включения в группу COVID-19-позитивных пациентов считали положительный ПЦР-тест и поражение легких по характеру «матового стекла», диагностированное на КТ. Нами проведен поиск статистически значимых отличий между течением заболевания в группах пациентов с различными половозрастными характеристиками, отличающихся наличием или отсутствием сопутствующих заболеваний. В качестве признака, опосредовано отражающего тяжесть протекания заболевания, использовали количество дней, проведенных в стационаре.

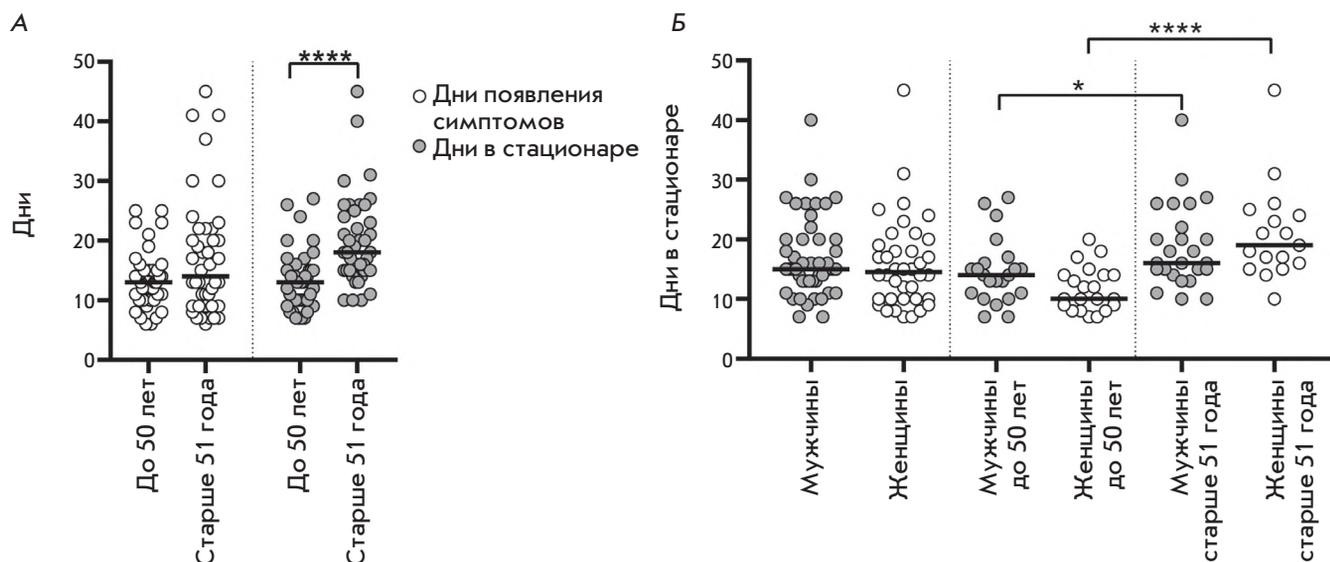


Рис. 1. Распределение количества дней, прошедших после появления симптомов, к моменту госпитализации (А), и дней, проведенных в стационаре (А, Б), среди пациентов различных возрастных групп

Анализ (рис. 1А) с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни показал, что количество дней, прошедших после появления симптомов до госпитализации, не отличается среди пациентов двух возрастных групп, также не выявлено корреляции между количеством дней и возрастом пациентов внутри двух возрастных групп. В то же время длительность госпитализации была выше в группе старше 51 года ($p < 0.0001$), что свидетельствует о более тяжелом течении болезни у пациентов старшего возраста. Анализ влияния пола на длительность госпитализации пациентов двух возрастных групп (рис. 1Б) выявил слабые различия между группами мужчин до 50 лет и после 51 года ($p = 0.0177$). Выявлено существенное различие ($p < 0.0001$) в длительности пребывания в стационаре женщин до 50 лет и старше 51 года. Не выявлено статистически значимых отличий в длительности госпитализации пациентов разного пола внутри двух возрастных групп и вне зависимости от возраста. Выявленные зависимости подтверждали корреляционным анализом; величина коэффициента корреляции Спирмена (r) была статистически значимой в группе женщин – $r = 0.65$, и незначительной в группе мужчин – $r = 0.31$. Дисперсионный анализ зависимости времени госпитализации от линейной комбинации факторов возраста и пола показал, что пол не является значимым фактором ($p = 0.719$), тогда как возраст, напротив, влияет на длительность госпитализации ($p < 0.0001$), причем в группе женщин данная зависимость была значительно сильнее, чем в группе мужчин ($p < 0.0001$ и $p = 0.0278$ соответственно). Таким образом, можно утверждать, что наблюдаемое отличие в длительности

госпитализации пациентов разных возрастных групп существенным образом обусловлено именно различием между женщинами более старшего (после 51 года) и более младшего (до 50 лет) возрастов.

Согласно опубликованным данным [4, 5, 23, 26], такие сопутствующие заболевания, как гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение, являются факторами риска тяжелого течения COVID-19. Мы исследовали влияние этих сопутствующих заболеваний на длительность госпитализации пациентов. Нами проведен анализ длительности пребывания в стационаре трех групп пациентов: 1) с гипертонической болезнью, сахарным диабетом или ожирением (ГСО), 2) с другими сопутствующими заболеваниями, 3) без сопутствующих заболеваний.

Результаты анализа на основе непараметрического критерия Манна–Уитни выявили значимое превышение ($p = 0.01$) длительности госпитализации пациентов группы с такими сопутствующими заболеваниями, как гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение, по сравнению с группой без сопутствующих заболеваний (рис. 2А). Однако дальнейший анализ показал, что возрастная медиана пациентов этих групп сильно различалась – 62 и 43 года соответственно. После выравнивания медианы между группами путем исключения из выборок пациентов максимального и минимального возраста соответственно, достоверного отличия в длительности госпитализации между группами не выявлено (рис. 2Б). Сравнение длительности госпитализации пациентов двух возрастных групп, имеющих ГСО, и пациентов без сопутствующих заболеваний (рис. 2В) указывает на отсутствие

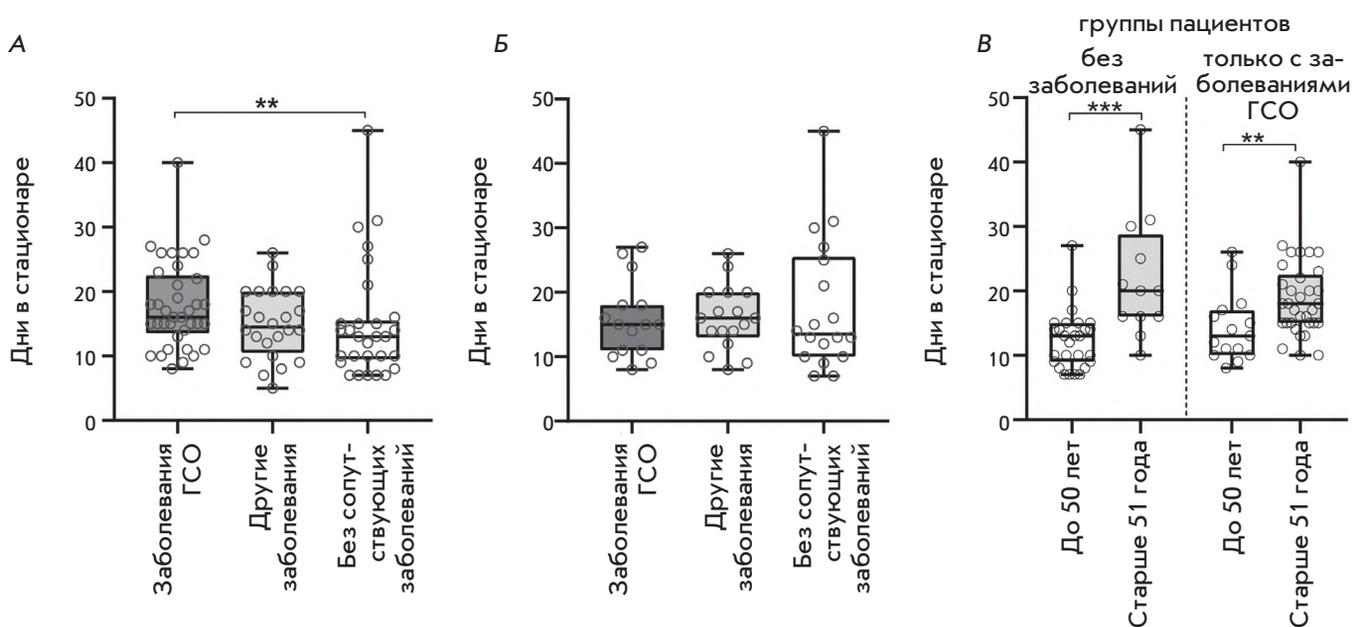


Рис. 2. Распределение количества дней, проведенных на стационарном лечении пациентами с/без сопутствующих заболеваний (А–В) и пациентов разных возрастных групп (В). А – группы пациентов без учета возраста; Б – группы пациентов с одинаковой возрастной медианой. В – сравнение средних значений длительности госпитализации пациентов возрастных групп, с/без сопутствующих заболеваний. ГСО – гипертоническая болезнь, сахарный диабет и ожирение

влияния рассматриваемых заболеваний. Влияние возраста статистически значимо как в группе пациентов, не имеющих сопутствующих заболеваний ($p = 0.0001$), так и в группе с указанными заболеваниями ($p = 0.0076$). При этом время госпитализации пациентов одинаковых возрастных групп, отличающихся наличием/отсутствием сопутствующих заболеваний, не отличалось статистически значимо. Таким образом, в исследованной когорте пациентов не обнаружено влияния сопутствующих заболеваний на тяжесть протекания COVID-19. Возможно, ранее опубликованные данные о существовании корреляции между тяжестью заболевания и наличием ряда сопутствующих заболеваний не учитывали возрастной дисбаланс в сравниваемых группах.

Для выявления различий в некоторых гематологических характеристиках в группах пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 когорту госпитализированных пациентов разделили на не нуждавшихся и нуждавшихся в ИВЛ. Результаты клинических исследований пациентов, нуждавшихся в ИВЛ, анализировали или суммарно, или выделяя две группы в зависимости от исхода заболевания (выздоровление или летальный исход). С помощью непараметрического критерия Манна–Уитни выявлено значимое ($p < 0.0001$) увеличение количества лейкоцитов у пациентов более возрастной группы (старше 51 года) по сравнению с группой до 50 лет (рис. 3А).

Эти данные соответствуют результатам других исследований [25–27].

Повышение количества лейкоцитов выявлено также у пациентов, находившихся на ИВЛ ($p = 0.006$), что согласуется с ранее полученными данными, согласно которым лейкоцитоз ассоциирован с тяжелым течением COVID-19 и высоким риском летального исхода [25, 28, 29]. Однако не обнаружено значимых различий между количеством лейкоцитов в группах пациентов, выздоровевших после терапии ИВЛ и скончавшихся, следовательно, некорректно рассматривать увеличение уровня лейкоцитов в качестве прогностического признака, определяющего исход заболевания. Тем не менее, ряд исследователей предлагает использовать в качестве прогностического маркера тяжести заболевания лейкоцитоз в комплексе с лимфопенией, точная природа которой остается неизвестной. Лимфопения по разным данным наблюдается в 40–80% случаев COVID-19 [30–32] и в значительной степени выражена у больных в критическом состоянии [5, 33]. Однако, несмотря на множество работ, указывающих на тесную связь между лимфопенией и тяжестью заболевания, в нашей когорте не обнаружено значимых различий в содержании лимфоцитов в группах больных с разной степенью тяжести COVID-19. Многие исследователи предлагают рассматривать в качестве прогностического признака С-реактивный белок (СРБ) [3, 36], вы-

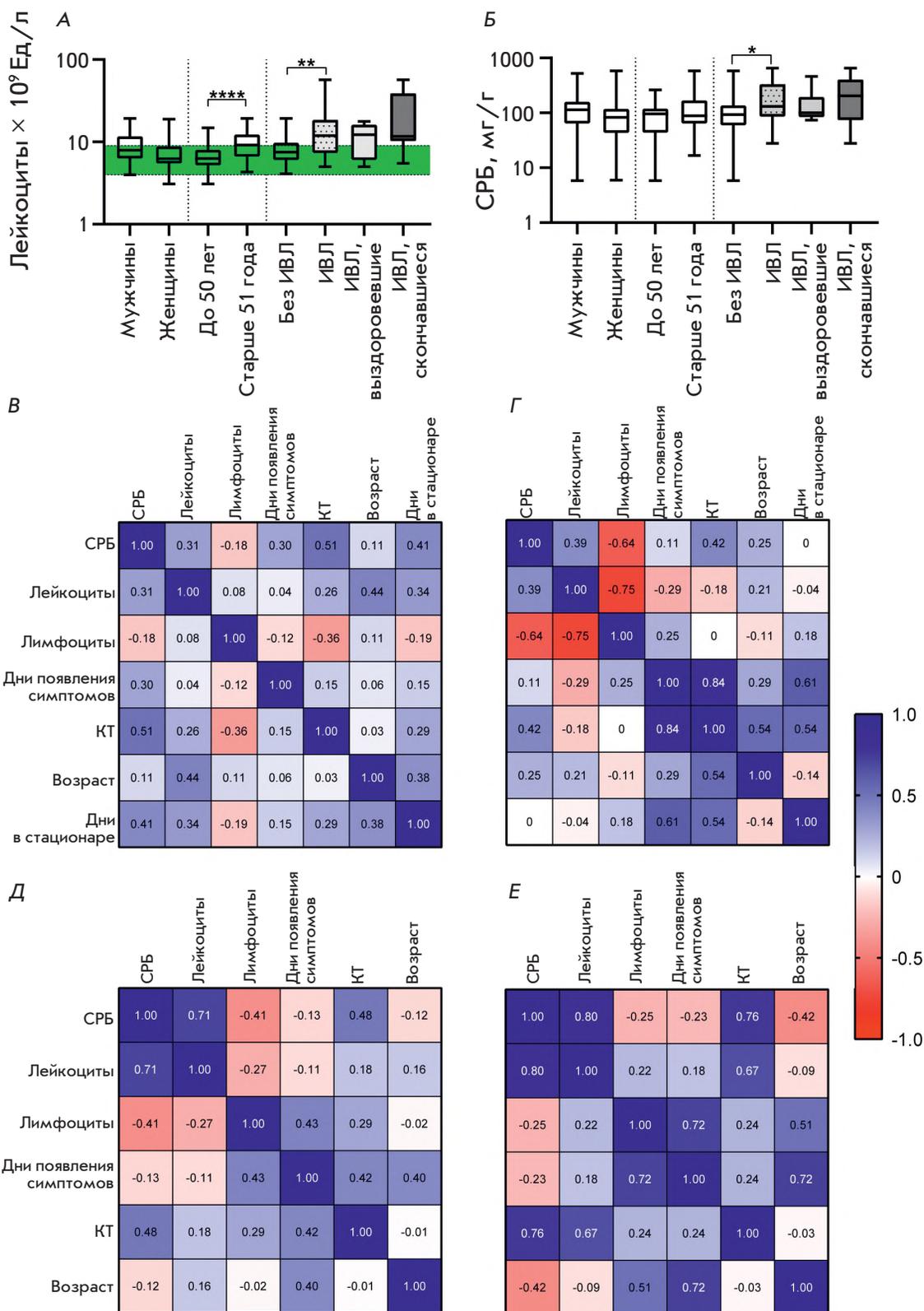


Рис. 3. Распределение количества лейкоцитов (А) и С-реактивного белка (Б) внутри групп пациентов разных возрастов, пола и течения заболевания. Зеленым отмечен коридор нормальных значений. В–Е – корреляционные зависимости для групп пациентов, не нуждавшихся в ИВЛ (В), нуждавшихся в ИВЛ (n = 16) (Д), с последующим выздоровлением (n = 7) (Г) или смертью (n = 9) (Е)

сокий уровень которого ассоциирован с ухудшением течения заболевания. В ряде работ [3, 5, 37] с высокой степенью значимости показано существенное увеличение содержания СРБ в крови пациентов в критическом состоянии. Однако некоторые исследователи [38] обнаруживают слабое отличие в содержании СРБ при различном сценарии течения болезни и даже отсутствие различий [39]. Среди групп исследуемой нами когорты слабое, но статистически значимое отличие ($p = 0.04$) средней концентрации СРБ обнаружено только между группами пациентов, в терапии которых использовали или не использовали ИВЛ (рис. 3В).

Корреляционный анализ внутри четырех групп пациентов: 1 – не находившихся на ИВЛ (рис. 3В); 2 – находившихся на ИВЛ (рис. 3Д); 3 – тех из них, кто впоследствии выздоровел (рис. 3Г); или (4) скончался (рис. 3Е), выявил во всех группах корреляцию (от умеренной до сильной) между уровнем СРБ и степенью поражения легких, тяжесть которого оценивали по данным КТ. Показано, что при воспалительных заболеваниях, в том числе пневмониях разного генеза, концентрация СРБ коррелирует с уровнем воспаления и не подвержена влиянию таких факторов, как возраст, пол, физическое состояние пациента. СРБ может использоваться для диагностики COVID-19, поскольку чувствительность диагностики с использованием только результатов КТ составляет 76.4%, а СРБ может выявить воспаление на ранних стадиях пневмонии [40].

Также в группах пациентов, находящихся на ИВЛ, обнаружена значимая корреляция между количеством лейкоцитов и СБР, умеренная в случае дальнейшего выздоровления и сильная в случае летального исхода, что может свидетельствовать об интенсивном воспалительном процессе.

Возможное отражение двух принципиально разных исходов COVID-19 у тяжелых пациентов, находящихся на ИВЛ, можно наблюдать через призму корреляционных зависимостей. У выздоровевших в дальнейшем пациентов наблюдается сильная корреляция ($r = 0.84$) между количеством дней после появления симптомов и тяжестью поражения легких. Возможно, из-за ослабления раннего противовирусного иммунитета у таких больных вирус SARS-CoV-2 приобретает на время персистирующий характер и постепенно увеличивает степень поражения легочной ткани, пока из-за симптомов, связанных с повреждениями легких, больного не госпитализируют. Последующая терапия, включающая ИВЛ, помогает в конечном итоге преодолеть вирусную инфекцию.

В настоящее время активно продолжают исследования гуморальных реакций адаптивного иммунитета при коронавирусной инфекции SARS-CoV-2,

направленные на установление связи между иммунологическими реакциями организма и разными сценариями течения заболевания, а также влияния на них различных факторов (пол, возраст, сопутствующие заболевания и др.). Противоречивость данных, полученных за последний год, делает необходимым дальнейшее их накопление и масштабный анализ. Мы сравнили качественные и количественные параметры В-клеточного иммунного ответа у различных групп пациентов с диагнозом COVID-19. Динамику иммунного ответа оценивали методом ИФА образцов сывороток крови 155 человек с подтвержденным диагнозом COVID-19, 105 из которых были госпитализированы в различные сроки после появления симптомов. В качестве антигенов использовали смесь рекомбинантных белков, фрагментов S-белка SARS-CoV-2 (RBD-SD1 и NTD) и рекомбинантный N-белок, полученные в прокариотической системе *E. coli* и адсорбированные в лунки планшета в денатурированном состоянии.

Результаты проведенного исследования (рис. 4А), выраженные в виде распределения рассчитанных индексов позитивности (ИП) образцов в зависимости от дней, прошедших после появления симптомов, выявляют различия в динамике появления антител, специфичных к использованным фрагментам вируса SARS-CoV-2, зависящие от времени после появления симптомов. Для иммуноглобулинов классов М, G и А медиана значений индекса позитивности, превышающая пороговое значение (ИП = 1), достигается к 6 дню после появления симптомов. Максимальные значения в случае иммуноглобулинов класса А определяются на 11–14 день, иммуноглобулинов класса М – к 15–20 дню, к иммуноглобулинам класса G – после 20 дня, что соответствует данным, полученным с использованием других тест-систем [8, 41]. Максимальная чувствительность ИФА-определения антител класса G с помощью разработанной нами тест-системы достигала 95.5% в диапазоне 15–20 дней после появления симптомов (рис. 4Б). В случае антител классов М и А максимальная чувствительность – 81.8 и 96.8%, наблюдалась в диапазоне 15–20 и 11–14 дней после появления симптомов соответственно и далее снижалась, оставаясь заметно выше в случае иммуноглобулинов А. Снижение чувствительности определения антител классов М и А методом ИФА может быть объяснено постепенным снижением содержания этих антител в кровотоке в более поздние сроки наблюдения [42, 43]. Наибольшая чувствительность ИФА (более 93.8%) и специфичность (98.6%) определения антител, специфичных к вирусу SARS-CoV-2, на протяжении всего исследуемого периода достигалась при суммарном определении иммуноглобули-

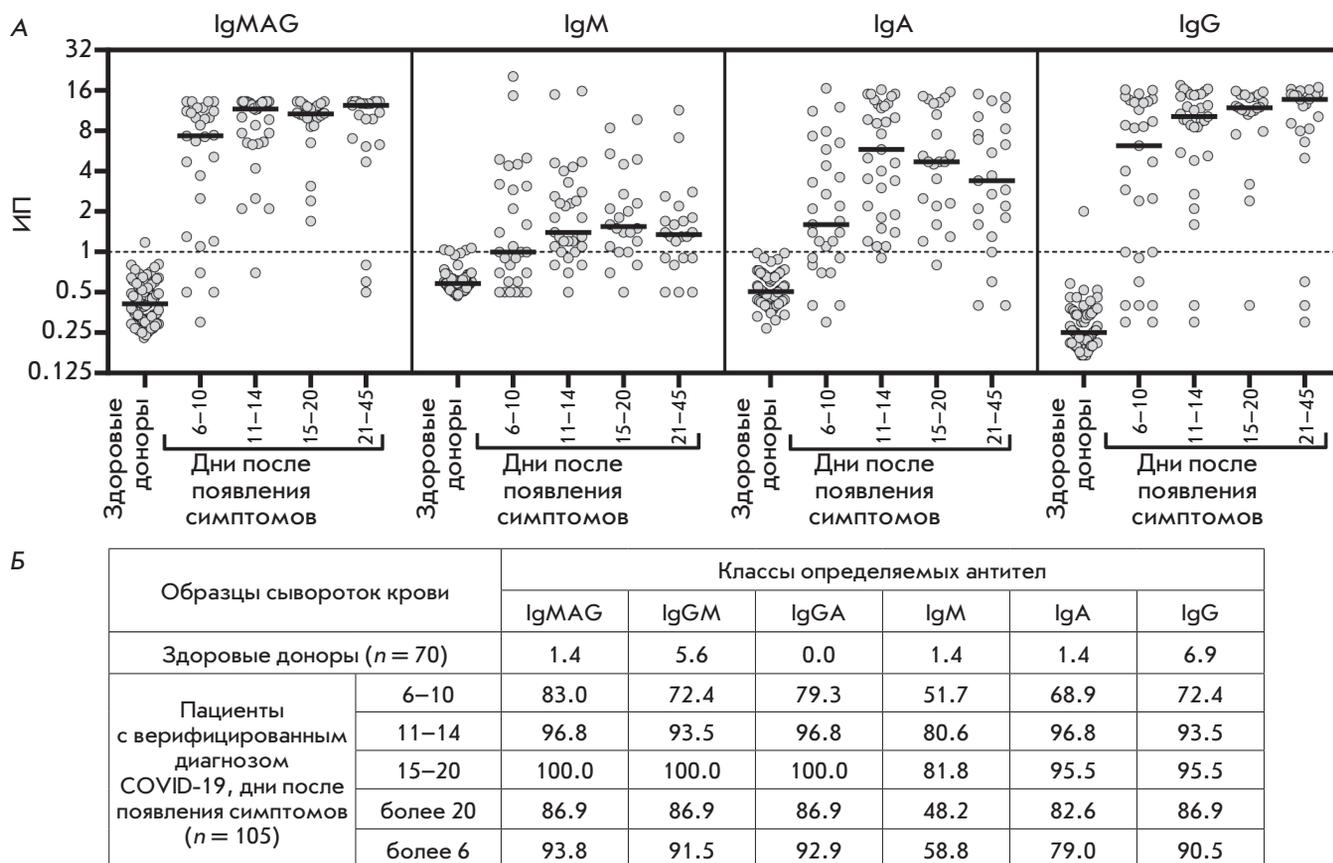


Рис. 4. Результаты серодиагностического тестирования методом ИФА образцов сывороток крови здоровых доноров и лиц с подтвержденным диагнозом COVID-19, в различные периоды после появления симптомов. А – индивидуальные значения индексов позитивности исследуемых образцов, рассчитанные при определении антител М, А и G, специфичных к SARS-CoV-2, по отдельности или одновременно. В качестве антигенов использовали смесь рекомбинантных белков, фрагментов RBD-SD1 и NTD S-белка SARS-CoV-2, и рекомбинантный N-белок. Индекс позитивности образца рассчитывали по отношению сигнал образца/среднее значение сигнала для образцов здоровых доноров (n = 70) + 3 стандартных отклонения. Пороговое значение (ИП = 1) отмечено пунктирной линией. Б – количество образцов, превышающих пороговое значение для одного или более указанных классов антител, специфичных к SARS-CoV-2, выраженное в %

нов классов М, G и А. Чувствительность определения антител классов М, А и G была несколько ниже и составила более 58,8, 79 и 90,5% соответственно. Для сравнения диагностической ценности тестов при выбранных значениях пороговых уровней применили ROC-анализ. Показатель AUC при анализе IgA составил 0,93 (95% CI: 0,90–0,96), при анализе IgM – 0,87 (95% CI: 0,83–0,92), при анализе IgG – 0,95 (95% CI: 0,93–0,98). Поскольку антитела классов М и А имеют схожую динамику появления и исчезновения в кровотоке, а абсолютные значения индексов позитивности образцов и рассчитанная чувствительность и диагностическая значимость ИФА в случае антител класса А значительно выше, чем для антител класса М, то можно утверждать, что для диагностики COVID-19 более оправдано определение иммуноглобулинов класса А.

С целью определения вклада каждого из антигенов в чувствительность ИФА в различные временные промежутки после появления симптомов мы оценивали уровень антител, специфичных к каждому из антигенов, отдельно. Анализ проводили, используя в качестве антигенов фрагменты RBD-SD1 и NTD S-белка, а также N-белок, полученные в прокариотической системе *E. coli* и адсорбированные в лунки планшета в денатурированном состоянии. Аналогичным образом полученный фрагмент RBD (RBD *E. coli*) использовали для оценки вклада SD1-специфичных иммуноглобулинов в чувствительность ИФА. В качестве антигена, представляющего конформационные эпитопы RBD, использовали рекомбинантный RBD (RBD CHO), полученный в эукариотической системе CHO. Результаты исследования (рис. 5А,В,Д) выявляют разную динамику

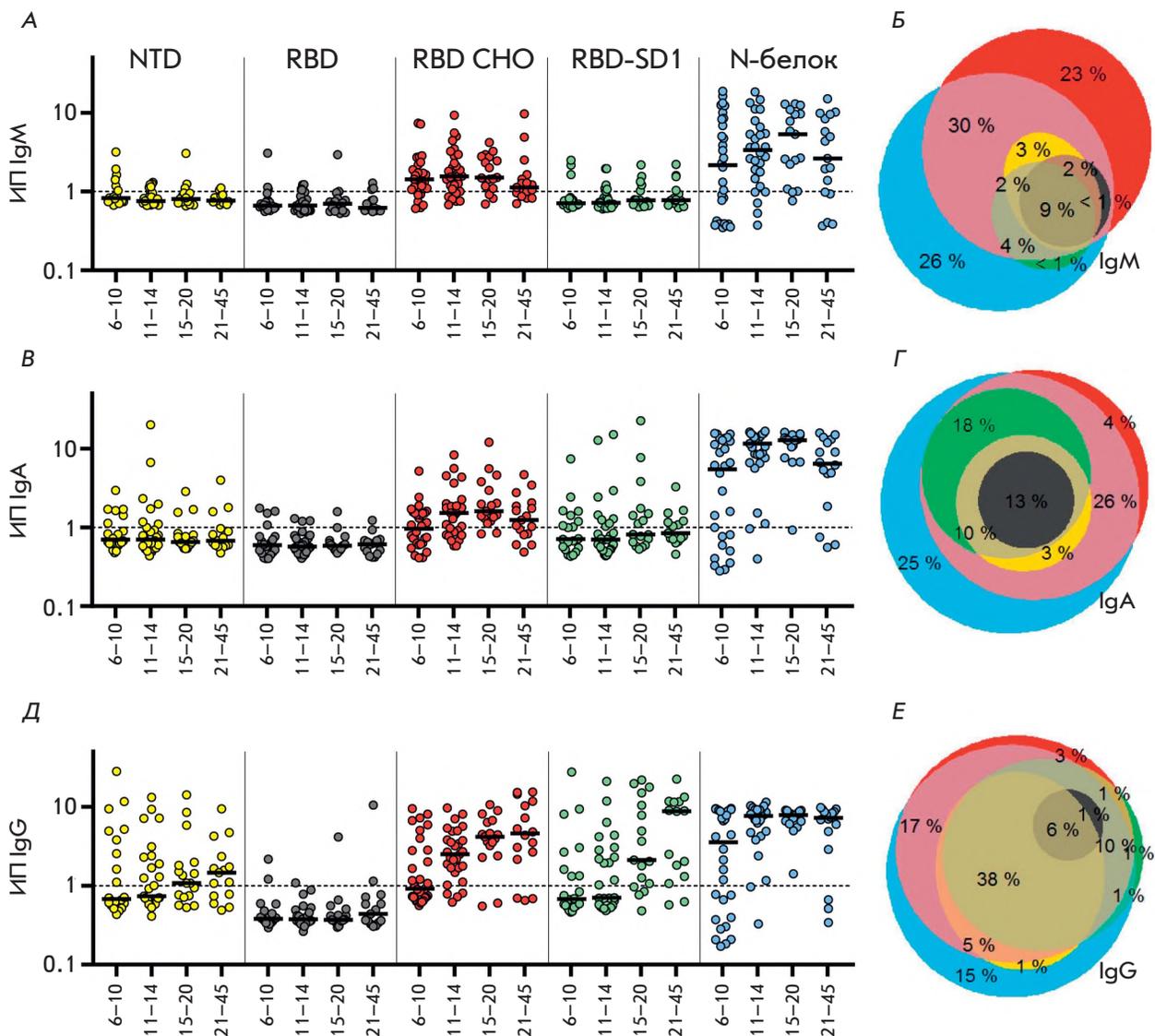


Рис. 5. Результаты серодиагностического тестирования методом ИФА образцов сывороток крови пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, госпитализированных в различные периоды после появления симптомов. А, В, Д – индивидуальные значения индексов позитивности образцов, рассчитанные при определении антител классов М (А), А (В) и G (Д), специфичных к фрагментам NTD, RBD, RBD-SD1 S-белка и N-белку вируса SARS-CoV-2. Б, Г, Е – диаграммы Венна, отражающие спектры антигенспецифичности иммуноглобулинов классов М (А), А (В) и G (Д) образцов

появления антител, зависящую от природы антигена и от времени после появления симптомов. Медианы значений индекса позитивности N- и RBD (CHO)-специфичных иммуноглобулинов классов М и А превышают пороговые значения к 6 дню после появления симптомов, достигая максимальных значений к 11–14 дню в случае RBD (CHO)-специфичных антител класса М и к 15–20 дню в других случаях, и снижаются после 3 недель наблюдения. В случае антигенов, представляющих линейные эпитопы S-белка (RBD (*E. coli*), RBD-SD1 и NTD), количество серопозитивных пациентов в каждом временном диа-

пазоне не превышало 10%, что не позволило медианам значений индекса позитивности иммуноглобулинов, специфичных к этим антигенам, превысить пороговое значение. Скорость сероконверсии иммуноглобулинов класса G, специфичных к N-белку вируса SARS-CoV-2, значительно выше скорости сероконверсии антител другой специфичности, медиана значений уровня N-специфичных антител значимо превышает пороговое значение уже к 6 дню после появления симптомов, достигая максимума на второй неделе. В то же время медиана значений уровня RBD (CHO)-специфичных конформационно-зависимых

антител превышает пороговое значение ко второй неделе после появления симптомов, достигая максимума в диапазоне 21–45 дней.

Для антител класса G, специфичных к антигенам NTD и RBD-SD1, содержащих линейные эпитопы, превышение порогового значения достигается только на третьей неделе после появления симптомов. Таким образом скорость сероконверсии ранних антител классов M и A несколько выше в случае антител, специфичных, главным образом, к конформационным эпитопам фрагмента RBD, чем для N-специфичных антител. И наоборот, скорость сероконверсии антител класса G убывает в ряду N-, конформационно-зависимых RBD (CHO)- и конформационно-независимых RBD-SD1/NTD-специфичных антител. Согласно полученным данным (рис. 5), наибольшей иммуногенностью обладает N-белок, что описано ранее [44], тогда как линейные эпитопы RBD и NTD имеют наименьшую иммуногенность. Таким образом, сильную иммуногенность RBD-фрагмента, известную ранее [45], в большей степени обеспечивают конформационные эпитопы. Линейные эпитопы субдомена SD1 обладают сильной, но медленно развивающейся иммуногенностью, что может быть особенно важным в свете данных о существовании нейтрализующих антител, специфичных именно к линейному эпитопу, расположенному в этой области [45]. Установлено, что спектры антигенспецифичности различаются в случае иммуноглобулинов классов M, A и G (рис. 5Б,Г,Е). Количество серопозитивных индивидов, в крови которых обнаруживаются антитела, специфичные только к одному «сильному» иммуногену, уменьшается в ряду иммуноглобулинов классов M, A и G и составляет 49, 29 и 19% от общего числа серопозитивных индивидов соответственно. Эти данные свидетельствуют о необходимости использования как минимум двух антигенов при проведении ИФА для диагностики COVID-19 с целью увеличения ее чувствительности, особенно на ранней стадии развития болезни.

Опубликованные к настоящему моменту данные, указывающие на влияние возраста на развитие В-клеточного иммунного ответа (в частности, на скорость сероконверсии и величину титра иммуноглобулинов) у больных COVID-19, остаются противоречивыми. В ряде исследований у пожилых пациентов наблюдали более высокий титр антител всех классов [8, 46, 47], в то же время опубликованы работы, в которых не выявлена связь между возрастом и В-клеточным ответом [48, 49]. Не выявлено влияния половой принадлежности пациентов на количество специфичных антител к SARS-CoV-2 [47, 48].

Мы сравнили содержание иммуноглобулинов классов M, A и G в крови пациентов разных возрастно-половых групп из когорты госпитализирован-

ных в разные временные промежутки после появления симптомов. С этой целью использовали ИФА и смесь рекомбинантных белков, фрагментов RBD-SD1 и NTD S-белка SARS-CoV-2, и рекомбинантный N-белок в качестве антигенов. Сравнение значений ИП в каждом временном промежутке с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни не выявило значимых различий в скорости сероконверсии между исследуемыми группами (рис. 6).

Для выявления отличий в уровне антител классов M, A и G, специфичных к разным фрагментам вируса SARS-CoV-2, у пациентов с разной степенью тяжести COVID-19, в когорту пациентов, не нуждавшихся и нуждавшихся в ИВЛ (среднее значение времени до госпитализации 21.2 дня), дополнительно включили группу индивидов ($n = 50$), перенесших заболевание в легкой форме вне стационара. Поскольку уровень антител в крови зависит от времени, прошедшего с момента появления симптомов, для корректного сравнения группу госпитализированных составили пациенты, госпитализированные через 15–45 дней (среднее значение 21.8 дней) после появления симптомов.

Анализ частоты встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам классов M или A, специфичных к одному или более используемых антигенов, выявил значительное уменьшение частоты в группе с легкой формой заболевания по сравнению с частотой госпитализированных пациентов, серопозитивных по каждому из антигенов (рис. 7А). В этой группе наблюдается также снижение частоты встречаемости иммуноглобулинов класса G, специфичных к линейным эпитопам RBD, NTD и RBD-SD1, тогда как частота встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам класса G, специфичных к RBD (CHO) и N-белку, не изменилась. В группе пациентов, находящихся на ИВЛ, также снижена частота индивидов, серопозитивных по одному или более классам антител рассматриваемых специфичностей. Однако подобное снижение обусловлено существенным снижением количества серопозитивных пациентов в подгруппе скончавшихся, тогда как в подгруппе выздоровевших и в группе госпитализированных эти характеристики сходны.

Анализ уровня антител классов M, A и G рассматриваемых специфичностей в серопозитивных сыворотках крови с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни не выявил статистически значимого влияния тяжести заболевания на уровень SARS-CoV-2-специфичных антител. Полученные результаты противоречат ряду данных, согласно которым в крови тяжелобольных повышено содержание иммуноглобулинов различных классов, а в группе па-

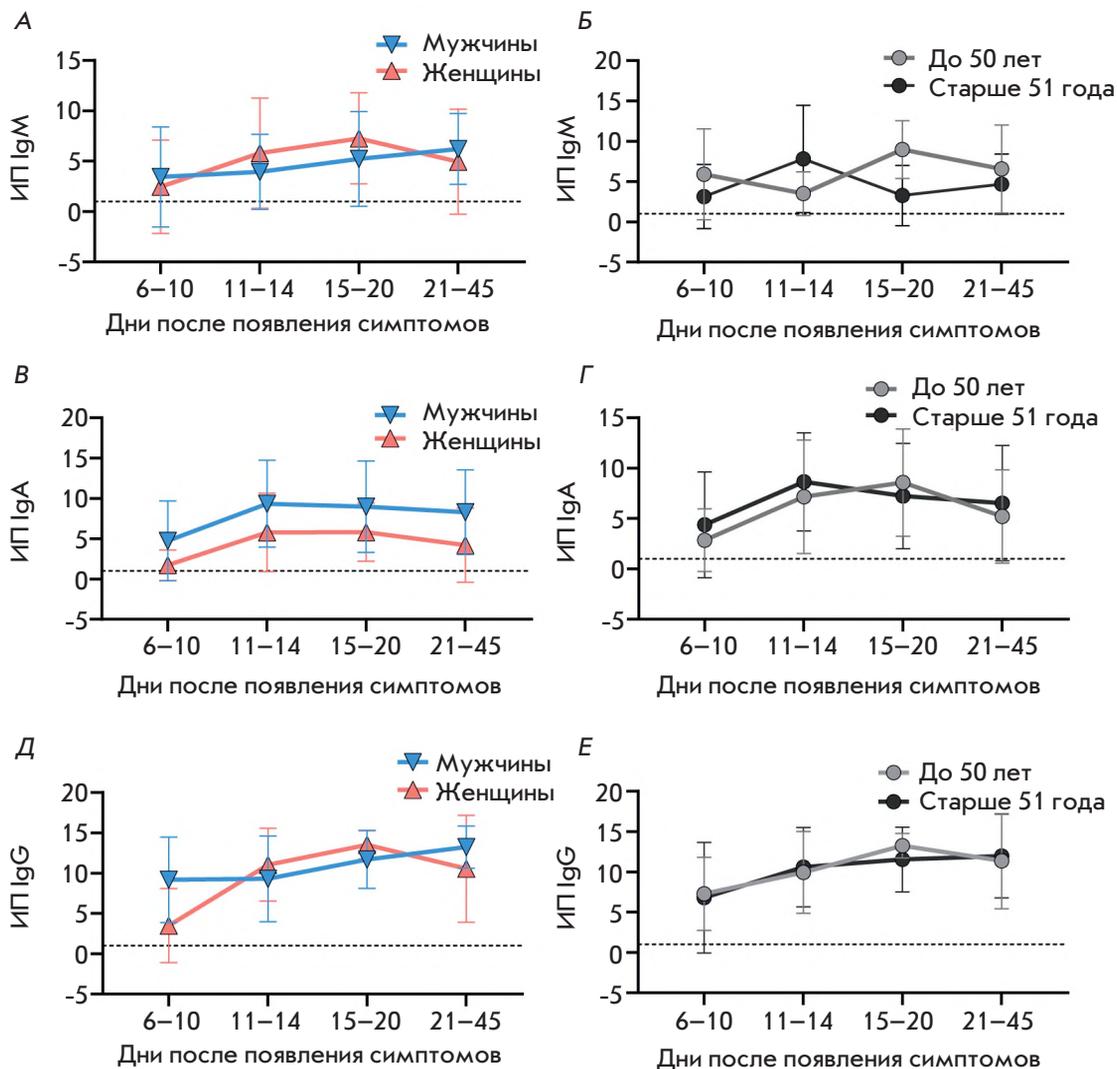


Рис. 6. Распределение индексов позитивности образцов крови пациентов в зависимости от дней после появления симптомов в группах мужчин и женщин (А, В, Д) и группах пациентов разного возраста (до 50 лет и после 51 года) (Б, Г, Е), рассчитанных при определении иммуноглобулинов классов М (А, Б), А (В, Г) и G (Д, Е), специфичных к SARS-CoV-2

циентов с бессимптомным течением болезни или с ее слабыми проявлениями снижено содержание антител [5, 8, 48, 50].

Анализ соотношения частот встречаемости подклассов иммуноглобулинов А и G в сыворотках соответствующих серопозитивных образцов (рис. 7Б,В) выявляет равномерную индукцию подклассов G1–G4 иммуноглобулина G и подклассов A1–A2 иммуноглобулина А, специфичных к N-белку, в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19, в то время как при иммунном ответе на S-антиген основными подклассами являются G1, G3 и A1. При более тяжелом течении болезни частота встречаемости антител G1, специфичных к S-антигенам, уменьшалась, а A2, наоборот, увеличивалась. Однако корреляции между уровнем SARS-CoV-2-специфичных антител исследуемых подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено.

дующих подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено.

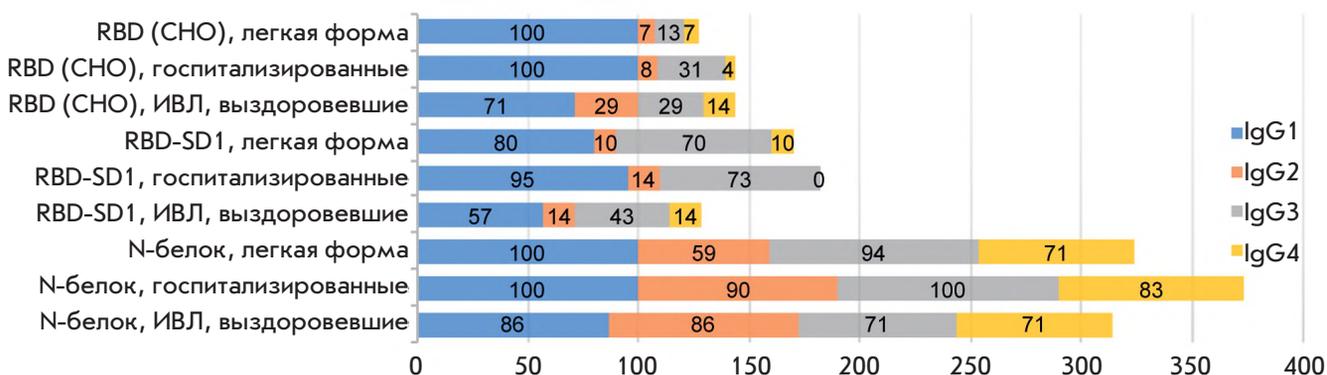
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно утверждать, что с использованием разработанного в настоящем исследовании диагностического набора для ИФА, основанного на рекомбинантных антигенах, фрагментах белков вируса SARS-CoV-2, нами с достаточной долей достоверности выявлено преимущество иммуноглобулинов класса А в качестве раннего иммунологического критерия развития заболевания. Спектр специфичности иммуноглобулинов, индуцируемых SARS-CoV-2 у каждого индивида, зависит от времени, после инфицирования, и изменяется в ряду иммуноглобулинов М, А, G от узкого к широкому. Нами также показана нерав-

A

Тяжесть протекания болезни	IgM					IgA					IgG				
	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N	NTD	RBD <i>E. coli</i>	RBD CHO	RBD-SD1	N
Легкая форма	5	0	19	5	19	0	2	35	16	40	23	5	88	56	84
Госпитализация	15	15	74	26	79	18	6	77	44	85	59	9	82	77	88
ИВЛ	6	13	38	6	75	25	19	44	25	75	25	0	50	38	69
ИВЛ, выздоровевшие	14	29	43	14	100	43	29	86	43	86	43	0	86	57	86
ИВЛ, скончавшиеся	0	0	33	0	56	22	11	11	11	67	11	0	22	11	56

Б



В



Рис. 7. Изменение частоты встречаемости индивидов, серопозитивных по иммуноглобулинам различных классов и подклассов, специфичных к антигенам SARS-CoV-2, в группах пациентов с различной степенью тяжести COVID-19. А – частота встречаемости (%) пациентов, серопозитивных по иммуноглобулинам классов М, А и G, специфичных к антигенам NTD, RBD, RBD-SD1 и N-белку в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19. Б – частота встречаемости (%) пациентов, серопозитивных по подклассам иммуноглобулинов G и A (B), специфичных к антигенам RBD (CHO), RBD-SD1 и N-белку, в группах пациентов с различной тяжестью COVID-19

номерная индукция подклассов иммуноглобулинов, зависящая от природы антигена. N-белок индуцирует иммуноглобулины G1–G4 и A1–A2 в равном соотношении, тогда как основными подклассами при иммунном ответе на S-антиген являются G1, G3 и A1. Соотношение между N-специфичными подклассами остается практически неизменным в группах пациентов с разной тяжестью COVID-19, но при более тяжелом течении болезни частота

встречаемости S-специфичных антител изотипа G1 уменьшается, а A2, наоборот, увеличивается. Однако корреляции между уровнем SARS-CoV-2-специфичных антител исследуемых классов и подклассов и тяжестью течения заболевания достоверно не выявлено. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 17-74-30019 и ICGEB CRP/RUS18-01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiuyuan Ou, Yan Liu, Xiaobo Lei, Pei Li, Dan Mi, Lili Ren, Li Guo, Ruixuan Guo, Ting Chen, Jiabin Hu, Zichun Xiang, et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 1. № 1. P. 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
2. Xiaofan Liu, Hong Zhou, Yilu Zhou, Xiaojun Wu, Yang Zhao, Yang Lu, Weijun Tan, Mingli Yuan, Xuhong Ding, Jinjing Zou, et al. // *J. Infect.* 2020. V. 81. № 1. P. e95-e97. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.008. Epub. 2020 Apr. 17.
3. Ahnach M., Zbiri S., Nejari S., Ousti F., Elkettani C. // *J. Med. Biochem.* 2020. V. 39. P. 1-8.
4. Berek A., Aziz A., Islam M.S. // *Heliyon.* 2020. V. 6. P. e05684.
5. Chuan Qin, Luoqi Zhou, Ziwei Hu, Shuoqi Zhang, Sheng Yang, Yu Tao, Cuihong Xie, Ke Ma, Ke Shang, Wei Wang, et al. // *China Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 10. 1093/cid/ciaa248.
6. Lavillegrand J.R., Garnier M., Spaeth A., Mario N., Hariri G., Pilon A., Berti E., Fieux F., Thietart S., Urbina T., et al. // *Ann. Intensive. Care.* 2021. V. 11. P. 9.
7. Yamada T., Wakabayashi M., Yamaji T., Chopra N., Mikami T., Miyashita H., Miyashita S. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 509. P. 235.
8. Huan Ma, Weihong Zeng, Hongliang He, Dan Zhao, Dehua Jiang, Peigen Zhou, Linzhao Cheng, Yajuan Li, Xiaoling Ma, Tengchuan Jin. // *Cell. Mol. Immunol.* 2020. V. 17. P. 773-775.
9. Debnath M., Banerjee M., Berk M. // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 7. P. 8787-8795. doi: 10.1096/fj.202001115R.
10. Mei-Shang Ho, Wei-Ju Chen, Hour-Young Chen, Szu-Fong Lin, Min-Chin Wang, Jiali Di, Yen-Ta Lu, Ching-Lung Liu, Shan-Chwen Chang, Chung-Liang Chao, et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2005. V. 11. № 11. P. 1730-1737. doi: 10.3201/eid1111.040659.
11. Li Guo, Xi Zhang, Lili Ren, Xuelian Yu, Lijuan Chen, Hongli Zhou, Xin Gao, Zheng Teng, Jianguo Li, Jiayu Hu, et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20. № 2. P. 192-200. doi: 10.3201/eid2002.131094.
12. Kelvin Kai-Wang To, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung, Anthony Raymond Tam, Tak-Chiu Wu, David Christopher Lung, Cyril Chik-Yan Yip, Jian-Piao Cai, Jacky Man-Chun Chan, Thomas Shiu-Hong Chik, et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2020. V. 20. № 5. P. 565-574. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
13. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays.* 2009. V. 31. № 11. P. 1161-1171. doi: 10.1002/bies.200900020.
14. Lili Ren, Ye-Ming Wang, Zhi-Qiang Wu, Zi-Chun Xiang, Li Guo, Teng Xu, Yong-Zhong Jiang, Yan Xiong, Yong-Jun Li, Xing-Wang Li, et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2020. V. 133. № 9. P. 1015-1024. doi: 10.1097/CM9.0000000000000722.
15. Kuldeep Dhama, Khan Sharun, Ruchi Tiwari, Maryam Dadar, Yashpal Singh Malik, Karam Pal Singh Wanpen Chaicumpa // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020. V. 16. № 6. P. 1232-1238. doi: 10.1080/21645515.2020.1735227.
16. Li Guo, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, De Chang, Fan Yang, Charles S Dela Cruz, Yingying Wang, Chao Wu, Yan Xiao, et al. // *Clin. Infect Dis.* 2020. V. 71. № 15. P. 778-785. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
17. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., et al. // *Lancet.* 2020. 396. V. 10. № 255. P. 887-897. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
18. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 384. № 5. P. 403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
19. van Doremalen N., Lambe T., Spencer A., Belij-Rammerstorfer S., Purushotham J.N., Port J.R., Avanzato V., Bushmaker T., Flaxman A., Ulaszewska M. // *bioRxiv.* 2020. V. 2020.05.13.093195. doi: 10.1101/2020.05.13.093195. Preprint
20. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46. № 1. P. 3-16. doi: 10.3892/ijmm.2020.4596.
21. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V., Dayanova L.K., Vorobiev I.I. // *PLoS One.* 2021. V. 16. № 2. P. e0242890. doi: 10.1371/journal.pone.0242890. eCollection 2021.
22. Durova O., Vorobiev I., Smirnov I., Reshetnyak A., Telegin G., Shamborant O., Orlova N., Genkin D., Bacon A., Ponomarenko N., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87-95. doi: 10.1016/j.molimm.2008.12.020.
23. Ahnach M., Zbiri S., Nejari S., Ousti F., Elkettani C. // *J. Med. Biochem.* 2020. V. 9. № 4. P. 500-507. doi: 10.5937/jomb0-27554.
24. Stefan N., Birkenfeld A.L., Schulze M.B. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021. V. 17. № 3. P. 135-149. doi: 10.1038/s41574-020-00462-1.
25. Kaochang Zhao, Ruiyun Li, Xiaojun Wu, Yang Zhao, Tao Wang, Zhishui Zheng, Shaolin Zeng, Xuhong Ding, Hanxiang Nie. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020. V. 39. № 12. P. 2279-2287. doi: 10.1007/s10096-020-03976-8.
26. Riley L.K., Rupert J. // *Am. Fam. Physician.* 2015. V. 92. № 11. P. 1004-1011.
27. Shapiro M.F., Greenfield S. // *Ann. Intern. Med.* 1987. V. 106. № 1. P. 65-74. doi: 10.7326/0003-4819-106-1-65.
28. Mei Y., Weinberg S.E., Zhao L., Frink A., Qi C., Behdad A., Ji P. // *E. Clin. Med.* 2020. V. 26. P. 100475. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100475. eCollection 2020 Sep.
29. Takayuki Yamada, Mako Wakabayashi, Takahiro Yamaji, Nitin Chopra, Takahisa Mikami, Hirota Miyashita, Satoshi Miyashita. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 509. P. 235-243. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.008.
30. Chaolin Huang, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, et al. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10223. P. 497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
31. Barnaby Edward Young, Sean Wei Xiang Ong, Shirin Kalimuddin, Jenny G Low, Seow Yen Tan, Jiashen Loh, Oon-Tek Ng, Kalisvar Marimuthu, Li Wei Ang, Tze Minn Mak, et al. // *JAMA.* 2020. V. 323. № 15. P. 1488-1494. doi: 10.1001/jama.2020.3204.
32. Wei-Jie Guan, Zheng-Yi Ni, Yu Hu, Wen-Hua Liang, Chun-Quan Ou, Jian-Xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-Liang Lei, David S C Hui, et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 18. P. 1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
33. Yan Deng, Wei Liu, Kui Liu, Yuan-Yuan Fang, Jin Shang, Ling Zhou, Ke Wang, Fan Leng, Shuang Wei, Lei Chen, et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2020. V. 133. № 11. P. 1261-1267. doi: 10.1097/CM9.0000000000000824.
34. Sharifpour M., Rangaraju S., Liu M., Alabyad D., Nahab F.B., Creel-Bulos C.M., Jabaley C.S. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 11. P. e0242400. doi: 10.1371/journal.pone.0242400. eCollection 2020.
35. Fang Liu, Lin Li, Meng Da Xu, Juan Wu, Ding Luo, Yu Si Zhu, Bi Xi Li, Xiao Yang Song, Xiang Zhou. // *J. Clin. Virol.* 2020. V. 127. P. 104370. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370.
36. Zhang Yitao, Chen Mu, Zhou Ling, Cheng Shiyao, Xue Jiaojie, Chen Zhichong, Peng Huajing, Ou Maode, Cheng Kanglin, Ou Yang Mao, et al. // *Curr. Med. Res. Opin.* 2021.

- V. 4. P. 1–14. doi: 10.1080/03007995.2021.1876005. Online ahead of print.
37. Chaochao Tan, Ying Huang, Fengxia Shi, Kui Tan, Qionghui Ma, Yong Chen, Xixin Jiang, Xiaosong Li. // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. № 7. P. 856–862. doi: 10.1002/jmv.25871.
38. Takatoshi Higuchi, Tsutomu Nishida, Hiromi Iwahashi, Osamu Morimura, Yasushi Otani, Yukiyoishi Okauchi, Masaru Yokoe, Norihiro Suzuki, Masami Inada, Kinya Abe. // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93. P. 2141–2148. doi: 10.1002/jmv.26599.
39. Jialin Xiang, Jing Wen, Xiaoqing Yuan, Shun Xiong, Xue Zhou, Changjin Liu¹, Xun Min // *MedRxiv.* 2020. Preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.20034447>
40. Ling W. // *Med. Mal. Infect.* 2020. V. 50. № 4. P. 332–334. doi: 10.1016/j.medmal.2020.03.007.
41. Grzelak L., Temmam S., Planchais C., Demeret C., Tondeur L., Huon Ch., Guivel-Benhassine F., Staropoli I., Chazal M., Dufloo J., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. № 559. P. eabc3103. doi: 10.1126/scitranslmed.abc3103.
42. Lili Ren, Lulu Zhang, De Chang, Junwen Wang, Yongfeng Hu, Hong Chen, Li Guo, Chao Wu, Conghui Wang, Yingying Wang, et al. // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 780. doi: 10.1038/s42003-020-01526-8.
43. Bin Lou, Ting-Dong Li, Shu-Fa Zheng, Ying-Ying Su, Zhi-Yong Li, Wei Liu, Fei Yu, Sheng-Xiang Ge, Qian-Da Zou, Quan Yuan, et al. // *Eur. Respir. J.* 2020. V. 56. № 2. P. 2000763. doi: 10.1183/13993003.00763-2020.
44. Burbelo P.D., Riedo F.X., Morishima Ch., Rawlings S., Smith D., Das S., Strich J.R., Chertow D.S., Davey R.T., Cohen J. // *J. Infect. Dis.* 2020. V. 222. № 2. P. 206–213. doi: 10.1093/infdis/jiaa273.
45. Chek Meng Poh, Guillaume Carissimo, Bei Wang, Siti Naqiah Amrun, Cheryl Yi-Pin Lee, Rhonda Sin-Ling Chee, Siew-Wai Fong, Nicholas Kim-Wah Yeo, Wen-Hsin Lee, Anthony Torres-Ruesta, et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 2806. doi: 10.1038/s41467-020-16638-2.
46. Madariaga M.L.L., Guthmiller J.J., Schrantz S., Jansen M.O., Christensen C., Kumar M., Prochaska M., Wool G., Durkin-Celauro A., Oh W.H., et al. // *J. Intern. Med.* 2020. Oct 9; 10.1111/joim.13185. doi: 10.1111/joim.13185.
47. Garcia-Basteiro A.L., Moncunill G., Tortajada M., Vidal M., Guinovart C., Jiménez A., Santano R., Sanz S., Méndez S., Llupià A., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3500. doi: 10.1038/s41467-020-17318-x.
48. Nilsson C.J., Zurbuchen Y., Valaperti A., Schreiner J., Wolfensberger A., Raeber M.E., Adamo S., Weigang S., Emmenegger M., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021. V. 147. № 2. P. 545–557.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2020.10.040. Carlo
49. Juan Chen, Zhen-Zhen Zhang, Yao-Kai Chen, Quan-Xin Long, Wen-Guang Tian, Hai-Jun Deng, Jie-Li Hu, Xian-Xiang Zhang, Pu-Liao, Jiang-Lin Xiang, et al. // *Genes Dis.* 2020. V. 7. № 4. P. 535–541. doi: 10.1016/j.gendis.2020.03.008.
50. Lynch K.L., Whitman J.D., Lacanienta N.P., Beckerdite E.W., Kastner Sh.A., Shy B.R., Goldgof G.M., Levine A.G., Bapat S.P., Stramer S.L., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa979. doi: 10.1093/cid/ciaa979.

УДК 612.017.1:57.04

Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей

А. А. Калинина¹, Л. М. Хромых¹, Д. Б. Казанский¹, А. В. Дейкин^{2,3}, Ю. Ю. Силаева^{2*}¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия²Центр коллективного пользования Института биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: silaeva@genebiology.ru, yulya.silaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 05.11.2020

Принята к печати 20.01.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11252

РЕФЕРАТ Пул периферических Т-лимфоцитов состоит из нескольких функционально различных популяций CD8⁺ клеток. CD44 и CD62L – основные поверхностные маркеры, по которым можно идентифицировать популяции Т-клеток и экспрессия которых зависит от функционального состояния Т-лимфоцита. В условиях лимфопении периферические Т-лимфоциты гомеостатически пролиферируют и приобретают фенотип суррогатных клеток памяти (memory-like, T_{ML}) CD44^{hi}CD62L^{hi}. Однако информация о функциональной активности данных клеток остается противоречивой. Нами изучено влияние адоптивного переноса сингенных спленоцитов на процессы восстановления CD8⁺ Т-клеток сублетально облученных мышей. Показано, что в условиях лимфопении донорские лимфоциты формируют популяцию CD8⁺ Т-клеток с фенотипом CD122⁺CD5⁺CD49d^{hi}CXCR3⁺, который сочетает в себе фенотипические характеристики истинных клеток памяти и супрессорных CD8⁺ Т-клеток. В экспериментах *ex vivo* установлено, что после адоптивного переноса Т-лимфоциты облученных мышей не проявляют функциональной активности истинных эффекторов клеток или клеток памяти, а иммунные ответы на аллоантигены и бактериальные патогены у этих животных оказываются значительно подавленными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА суррогатная Т-клетка памяти, лимфопения, гомеостатическая пролиферация, CD44, CD62L.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МНС – главный комплекс гистосовместимости; T_{ML} – суррогатные клетки памяти; MLR – смешанная культура лимфоцитов; cpm – импульсы в минуту; АП – адоптивный перенос; ТКР – Т-клеточный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Пул периферических Т-лимфоцитов состоит из нескольких функционально различающихся популяций CD8⁺ Т-клеток. Основными поверхностными маркерами этих популяций являются CD44 и CD62L, экспрессия которых определяет активационный фенотип и особенности миграции Т-клетки. Молекула CD62L опосредует взаимодействие Т-лимфоцита с клетками венул с высоким эндотелием и его миграцию в лимфоидной системе. CD44, рецептор гиалуроновой кислоты во внеклеточном матриксе, позволяет Т-клетке покинуть лимфоидную систему и мигрировать в периферические ткани [1]. Профиль экспрессии этих маркеров зависит от функционального состояния Т-лимфоцита. Наивные Т-клетки имеют фенотип CD62L^{hi}CD44^{lo}; клоны CD8⁺ клеток, активи-

рованные в ходе первичного иммунного ответа, теряют экспрессию CD62L и приобретают фенотип CD62L^{lo}CD44^{hi}. Большинство CD8⁺ эффекторов погибает по завершении иммунного ответа, небольшая их доля формирует пул долгоживущих Т-клеток памяти, способных поддерживать стабильный пул и ускоренно отвечать на специфический антиген.

Долгоживущие CD8⁺ Т-клетки памяти имеют фенотип CD44^{hi}CD62L^{hi}, который, однако, не всегда коррелирует с «антигенным опытом» Т-лимфоцита. Известно, что пул периферических Т-клеток неиммунизированных животных – гнотобионтов содержит виртуальные клетки памяти, специфичные к модельному антигену [2, 3]. В условиях лимфопении периферические Т-клетки гомеостатически пролиферируют и приобретают поверхностный фенотип

клеток памяти CD44⁺CD62L⁺ (T_{ML}, суррогатные клетки памяти) [4–7]. T_{ML}-клетки не способны подавить экспрессию поверхностных активационных молекул и вновь приобрести фенотип наивных клеток [8, 9]. Таким образом, данная популяция фенотипически аналогична истинным клеткам памяти.

Экспериментальные данные о функциональных особенностях T_{ML}-клеток остаются противоречивыми. В ряде работ показано, что адаптивный перенос наивных CD8⁺ Т-клеток в условиях лимфопении приводит к формированию популяции Т-лимфоцитов с функциональными особенностями истинных клеток памяти [10, 11]. Тем не менее, локализация и профиль экспрессии хемокиновых рецепторов отличают данную популяцию от истинных клеток памяти [12]. Описана популяция T_{ML}-клеток с супрессорной активностью [13]. Кроме того, при лимфопении наблюдается гомеостатическая пролиферация клонов Т-клеток с высокой аффинностью Т-клеточного рецептора к собственным молекулам МНС (потенциально аутореактивных клонов), которые приобретают фенотип клеток памяти [14, 15]. В ряде исследований описана популяция CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-лимфоцитов с супрессорной активностью [13, 16–18].

Эти данные позволяют утверждать, что поверхностный фенотип Т-лимфоцитов не всегда отражает их истинный функциональный статус, и исследуемая популяция может быть ошибочно отнесена к долгоживущим CD8⁺ Т-клеткам памяти. Мы проанализировали связь между экспрессией поверхностных маркеров CD44 и CD62L и функциональными особенностями популяций CD8⁺ Т-клеток в условиях лимфопении. Оказалось, что адаптивный перенос сингенных лимфоцитов сублетально облученным мышам приводит к подавлению иммунного ответа у этих животных, что может быть, по крайней мере отчасти, обусловлено действием T_{ML} CD8⁺ Т-клеток с фенотипом CD122⁺CD5⁺CD49d^{hi}CXCR3⁺, сформированных из популяции донорских лимфоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши

Мышей линий C57BL/6 (K^bI-A^bD^b), B10.D2(R101) (K^dI-A^dI-E^dD^b), FVB (K^qI-A^qI-E^qD^q) и C57BL/6-TgN(АСТЬEGFP)10sb (K^bI-A^bD^b) (далее В6.GFP) получали из разведения вивария Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и Института биологии гена РАН (Москва, Россия).

Клеточные линии

Клетки лимфомы EL4 получены из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. EL4 прививали внутрибрюшинно (в/б) сингенным мышам C57BL/6 (3.0–5.0 × 10⁶ клеток/мышь) и наращивали в асцитной форме в течение 10–14 дней. Опухолевые клетки стерильно отбирали из брюшного асцита и 3 раза отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4) центрифугированием (200 g) при 4°C. Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и использовали для иммунизации мышей.

Бактериальные штаммы и условия культивирования

Вирулентный штамм *Salmonella typhimurium* IE 147 и вирулентный штамм *Listeria monocytogenes* EGD получены из коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия). Штамм *S. typhimurium* выращивали в среде LB (Amresco, США) в течение ночи при 37°C, затем высевали серийные 10-кратные разведения культуры на SS-агар (Condalab, Испания) и подсчитывали количество колоний по стандартной методике. Штамм *L. monocytogenes* выращивали в среде ВНИ (BD, США) в течение ночи при 37°C в термостатируемом шейкере (Shaker-thermostat ES 20 Biosan, Латвия) при 185 об/мин. Полученную культуру разводили в соотношении 1 : 100 в 200 мл среды ВНИ и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37°C и 85 об/мин до достижения оптической плотности культуры (OD₆₀₀) 1.5–1.8. Титр бактерии (КОЕ/мл) определяли на спектрофотометре ULTROSPEC 10 (General Electric, США). Свежие культуры *S. typhimurium* и *L. monocytogenes* инактивировали нагреванием (1 ч, 60°C и 90 мин, 74°C соответственно) и использовали в *in vitro* экспериментах.

Иммунизация

Мышей линии B10.D2(R101) иммунизировали в/б 2.0 × 10⁷ клеток EL4/мышь. Контрольным неиммунизированным животным вводили PBS. Через 60 дней мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, извлекали селезенки и готовили суспензии клеток.

Облучение мышей

Самок мышей линий B10.D2(R101) и C57BL/6 сублетально облучали в дозе 4.5 Гр (терапевтический аппарат «Агат-Р» (Россия), источник γ-излучения Co⁶⁰ с начальной мощностью 1.9 × 10¹⁴ Бк). Мышей умерщвляли на 10 день после облучения, и их спленоциты анализировали методом проточной цитофлуориметрии и функциональных тестов *ex vivo*.

Подготовка суспензии клеток

Селезенки гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с коническим пестиком в PBS при 4°C, спленоциты осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Эритроциты лизировали в лизирующем буфере (BD Pharmingen, США). Мононуклеары 3 раза промывали PBS центрифугированием при 4°C. Клетки ресуспендировали в PBS для окрашивания моноклональными антителами и адоптивного переноса или в полной ростовой среде для *in vitro* тестов.

Адоптивный перенос

Неиммунизированных мышей линии B10.D2(R101) облучали в дозе 4.5 Гр. Через 24 ч после облучения мышам внутривенно (в/в) вводили 1.5×10^7 спленоцитов неиммунизированных и иммунизированных сингенных животных. Контрольным облученным мышам вводили PBS в качестве плацебо. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты мышей-реципиентов использовали как респондеры в *in vitro* тестах. Аналогичным образом облучали мышей C57BL/6 и в/в вводили спленоциты неиммунизированных мышей B6.GFP. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей использовали для цитофлуориметрического анализа. На 10 день после адоптивного переноса в селезенке облученных мышей-реципиентов обнаруживали около 5% GFP⁺ клеток (рис. 1).

Смешанная культура лимфоцитов (MLR)

Клетки селезенки мышей FVB (K^{qI}-A^{qI}-E^{qD}) и C57BL/6 (K^{bI}-A^{bD}) использовали в качестве неспецифических и специфических стимуляторов

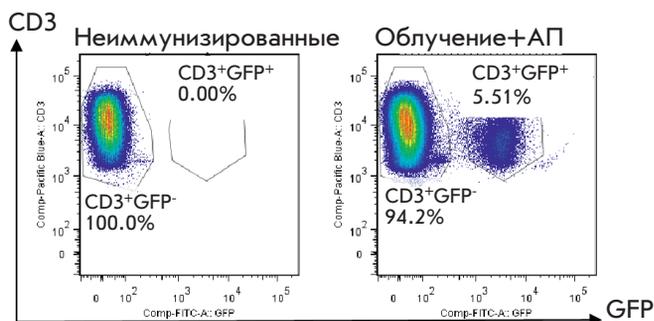


Рис. 1. Относительное количество GFP^{hi} CD3⁺ донорских клеток в селезенке сублетально облученных мышей-реципиентов. Цитофлуориметрический анализ GFP^{hi} CD3⁺ клеток в селезенке мышей-реципиентов линии C57BL/6 на 10 день после адоптивного переноса. Относительное количество GFP^{hi} CD3⁺ (GFP⁺) клеток в селезенке облученных мышей (слева) и облученных мышей после адоптивного переноса спленоцитов сингенных мышей BL6.GFP (справа). Данные представлены для 2.5×10^6 событий. Представлены данные одного из трех независимых репрезентативных экспериментов, три мыши в группе

соответственно. Спленоциты мышей B10.D2(R101) использовали в качестве сингенного контроля. Клетки-стимуляторы обрабатывали митомицином С (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Япония) (25 мкг/мл, 37°C, 30 мин) и 3 раза отмывали PBS центрифугированием (200 g, 5 мин, 4°C). Респондеры (3.0×10^5 клеток/лунку) и стимуляторы (5.0×10^5 клеток/лунку) помещали (3 : 5) в 96-луночные круглодонные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) и культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США), 0.01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Novo Mesto, Словения), 0.01 М HEPES («ПанЭко») и 10 мМ 2-меркаптоэтанола (Merck, Германия) при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. Уровень пролиферации клеток измеряли по включению ³H-тимидина («Изотоп», Россия), который вносили за 8 ч до окончания культивирования. Уровень пролиферативной активности клеток выражали в количестве импульсов в минуту (срм).

Ex vivo иммунный ответ на патогены

5.0×10^5 спленоцитов облученных мышей B10.D2(R101) и облученных мышей B10.D2(R101) через 10 дней после адоптивного переноса сингенных спленоцитов от неиммунизированных мышей помещали в 96-луночные круглодонные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich) с 10^6 – 10^7 КОЕ/мл прогретых клеток *L. monocytogenes* (штамм EGD) или 10^5 КОЕ/мл прогретых клеток *S. typhimurium* (штамм IE 147), подготовленных как описано выше. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко»), обогащенной как описано выше, при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. Для оценки фоновой пролиферации спленоциты культивировали без бактерий. Уровень пролиферации клеток определяли описанным выше образом. Индекс патоген-индуцированной пролиферации вычисляли как соотношение уровня пролиферации клеток в присутствии бактерий к фоновой пролиферации.

Динамика роста и отторжения клеток лимфомы EL4 *in vivo*

Сублетально облученным мышам B10.D2(R101) (с или без адоптивного переноса сингенных спленоцитов) прививали подкожно 0.25 мл суспензии клеток лимфомы EL4 (8.0×10^7 кл/мл). Опухоль измеряли на 7, 14 и 21 день после прививки. Полное отторжение лимфомы EL4 устанавливали по отсутствию подкожных опухолевых узлов при пальпации.

Антитела

В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD8α – Percp-Cy5.5 (клон 53-6.7, BD

Biosciences, США), анти-CD62L – APC-Cy7 (клон MEL-14, eBioscience, США), анти-CD44 – APC (клон IM7, eBioscience), анти-CD3 – PE-Cy7 (клон 145-2C11, eBioscience), анти-CD122 – PE (клон TM-β1, BD Biosciences), анти-CD49d – PE (R1-2, BD Biosciences), анти-CD5 – BV421 (клон 53-7.3, BD Biosciences) и анти-CXCR3 – BV421 (клон CXCR3-173, BD Biosciences).

Цитофлуориметрический анализ

Пробы клеток (3.0×10^6) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) (10 мин, 4°C) и окрашивали флуоресцентно меченными антителами (40 мин, 4°C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Мертвые клетки исключали из анализа по параметрам прямого и бокового светорассеяния и по включению пропидий йодида (BD Bioscience) или 7-AAD (BioLegend, США). Минимум 10^6 событий/образец анализировали при характеристике популяций периферических Т-клеток. Данные обрабатывали в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

Статистический анализ

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистический анализ проводили с использованием непарного критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей

В исследовании влияния адоптивного переноса сингенных спленоцитов на функциональное состояние иммунной системы сублетально облученных мышей в качестве доноров спленоцитов использовали неиммунизированных и иммунизированных животных (рис. 2А,Б). Облучение иммунизированных мышей приводит к незначительному (в 1.6 раза) подавлению специфического иммунного ответа по сравнению с контрольной группой иммунизированных необлученных мышей, при этом уровень неспецифического аллогенного иммунного ответа остается без изменений (рис. 2А). У облученных мышей с адоптивно перенесенными спленоцитами неиммунизированных или иммунизированных животных наблюдалось сильное подавление и специфического, и неспецифического аллогенного иммунного ответа *ex vivo* (рис. 2Б). В соответствии с этими данными, у облученных мышей после адоптивного переноса также

отмечена более длительная динамика отторжения лимфомы EL4 *in vivo* по сравнению со всеми контрольными группами (рис. 3).

Обнаружено также значительное подавление иммунного ответа на *L. monocytogenes* и *S. typhimurium* у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса по сравнению с контрольной группой облученных мышей (рис. 2В). Стоит особо отметить, что *ex vivo* иммунный ответ на патогены у облученных мышей без адоптивного переноса не отличался от значений в группе необлученного контроля (рис. 2В).

Фенотипические характеристики CD3⁺CD8⁺ Т-клеток донора и реципиента у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса

Мы предположили, что наблюдавшееся подавление иммунного ответа у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса сингенных спленоцитов могло быть обусловлено снижением абсолютного количества клеток и относительного количества CD3⁺ Т-лимфоцитов в селезенке этих животных. Для проверки данной гипотезы мы перенесли спленоциты мышей B6.GFP сублетально облученным мышам C57BL/6 и проанализировали отдельно популяции Т-клеток реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺). Доля GFP⁺-клеток донора в селезенке облученных реципиентов составляла 5% (рис. 1).

Абсолютное количество клеток в селезенке облученных мышей было снижено в 4.9 раза по сравнению с необлученными мышами (рис. 4А). При адоптивном переносе сингенных спленоцитов отмечено увеличение клеточности селезенки в 1.5 раза по сравнению с контрольными облученными мышами ($p \leq 0.01$; рис. 4А).

Сублетальное облучение привело к снижению относительного количества CD3⁺ клеток в селезенке по сравнению с необлученным контролем (рис. 4Б). На 10 день после адоптивного переноса относительное количество GFP⁻ CD3⁺ клеток в селезенке облученных мышей практически достигало уровня CD3⁺ клеток в селезенке необлученных животных (рис. 4Б). Доля CD3⁺ клеток донора (GFP⁺) в 2 раза превышала относительное количество GFP⁻ Т-клеток реципиента в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 4Б).

Популяция CD8⁺ Т-клеток у облученных мышей и среди лимфоцитов реципиента (GFP) облученных мышей после адоптивного переноса не была изменена по сравнению с необлученным контролем (рис. 4В). Однако популяция донорских (GFP⁺) Т-лимфоцитов в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса на 70% состояла из CD8⁺ клеток, что в 1.8 раза превышало относительное количество CD3⁺CD8⁺ клеток реципиента (рис. 4В). Мы предположили, что при адоптивном переносе то-

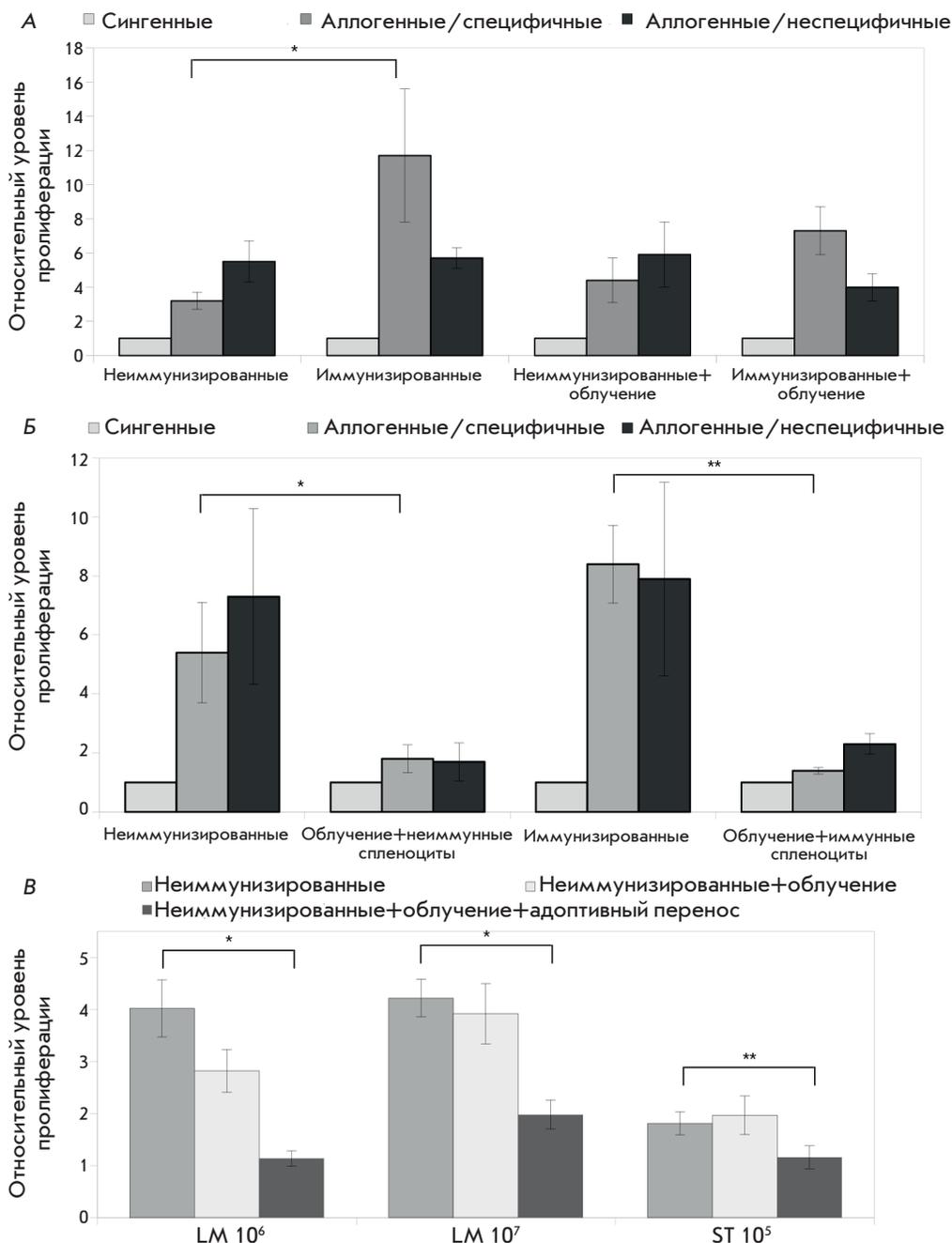


Рис. 2. Анализ функциональной активности *ex vivo* спленоцитов мышей в условиях лимфопении. А – уровень пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей в MLR. Мышей B10.D2(R101) – неиммунизированных (Неиммунизированные облученные) или иммунизированных (Иммунизированные облученные) – сублетально облучали. Через 10 дней спленоциты этих мышей использовали в качестве респондеров в MLR. Спленоциты мышей B10.D2(R101) (KdDb) (Сингенные стимуляторы), C57BL/10 (KbDb) (Аллогенные/специфические стимуляторы) и FVB (H-2q) (Аллогенные/неспецифические стимуляторы), обработанные митомицином С, использовали в качестве стимуляторов. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Пролиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Относительный уровень пролиферации определяли как соотношение аллогенного и сингенного ответа. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Иммунизированных необлученных мышей использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, три мыши в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (**p* ≤ 0.05). Б – уровень пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) облучали сублетально и *in vivo* вводили спленоциты неиммунизированных (Облученные + Неиммунизированные клетки) или иммунизированных

ванных (Облученные + Иммунизированные клетки) сингенных мышей. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей использовали в качестве респондеров в MLR. Спленоциты мышей B10.D2(R101) (KdDb) (Сингенные стимуляторы), C57BL/10 (KbDb) (Аллогенные/специфические стимуляторы) и FVB (H-2q) (Аллогенные/неспецифические стимуляторы), обработанные митомицином С, использовали в качестве стимуляторов. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Проллиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Относительный уровень пролиферации определяли как соотношение аллогенного и сингенного ответа. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Иммунизированных необлученных мышей использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, три мыши в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). В – уровень патоген-индуцированной пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) сублетально облучали и в/в вводили тотальные спленоциты неиммунизированных сингенных мышей. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей помещали в культуру *in vitro* с 10^6 КОЭ/мл (LM 10^6) или 10^7 КОЭ/мл (LM 10^7) инактивированных прогреванием клеток бактерии *Listeria monocytogenes* (штамм EGD) или с 10^5 КОЭ/мл (ST 10^5) инактивированных прогреванием клеток бактерии *Salmonella typhimurium* (штамм IE 147) на 72 ч. Проллиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Индекс патоген-индуцированной пролиферации определяли как отношение уровня пролиферации клетке в присутствии бактерии к фоновой пролиферации. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Неиммунизированных облученных мышей B10.D2(R101) использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, 3–6 мышей в группе

тальных спленоцитов облученному реципиенту вызывают и гомеостатически пролиферируют преимущественно CD8⁺ Т-клетки донора. Это согласуется с результатами ранних работ, в которых показано, что CD8⁺ клетки нуждаются в меньшем наборе стимулов для гомеостатической пролиферации по сравнению с CD4⁺ Т-лимфоцитами [19].

При сублетальном облучении в популяции CD8⁺ Т-клеток реципиента (GFP⁻) снизилось относительное количество наивных клеток и увеличилась доля клеток памяти и эффекторных клеток по сравнению с необлученным контролем (рис. 4Г). Среди донорских (GFP⁺) CD8⁺ Т-лимфоцитов в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса 60% клеток имели фенотип клеток памяти (рис. 4Г).

В ряде исследований обнаружены регуляторные CD8⁺CD122⁺ Т-клетки с супрессорной активностью [15]. Мы проанализировали экспрессию маркера CD122 в популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺) в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 4Д,Е). Более 97% донорских CD8⁺ Т-лимфоцитов приобрели фенотип CD8⁺CD122⁺ (рис. 4Д), при этом относительное количество CD8⁺CD122⁺ Т-клеток среди лимфоцитов реципиента не отличалось от контрольных значений в группах облученных и необлученных мышей (рис. 4Д). Уровень экспрессии CD122 в субпопуляциях клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺) и эффекторных клеток (CD44⁺CD62L⁻) среди Т-лимфоцитов донора (GFP⁺) был значимо выше, чем в данных субпопуляциях среди клеток реципиента (GFP⁻) (рис. 4Е).

Для определения потенциально аутореактивных Т-клеток среди донорских лимфоцитов мы проанализировали экспрессию маркера CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток (рис. 5 А,Б,В). Практически все

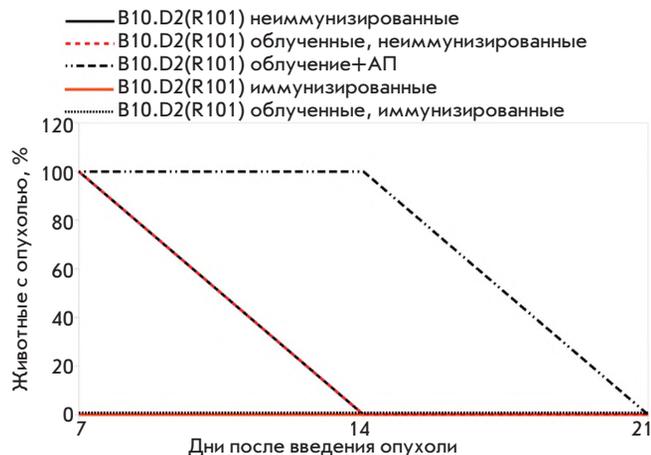


Рис. 3. Динамика отторжения лимфомы EL4 у сублетально облученных мышей B10.D2(R101) после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) сублетально облучали и через 10 дней прививали подкожно 20.0×10^6 клеток EL4. Одновременно с прививкой опухоли проводили адоптивный перенос сингенных спленоцитов. Экспериментальные группы: неиммунизированные необлученные мыши B10.D2(R101) (неиммунизированные), иммунизированные необлученные мыши B10.D2(R101) (иммунизированные), неиммунизированные облученные мыши B10.D2(R101) (неиммунизированные облученные), иммунизированные облученные мыши B10.D2(R101) (иммунизированные облученные) и неиммунизированные облученные мыши с адоптивным переносом B10.D2(R101) (облученные + АП). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента, три мыши в группе

GFP⁺ CD8⁺CD44⁺ Т-клетки экспрессировали CD5 (рис. 5А), при этом соотношение CD5⁺/CD5⁻ клеток в популяции CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов реципиента (GFP⁻) не было изменено по сравнению со значени-

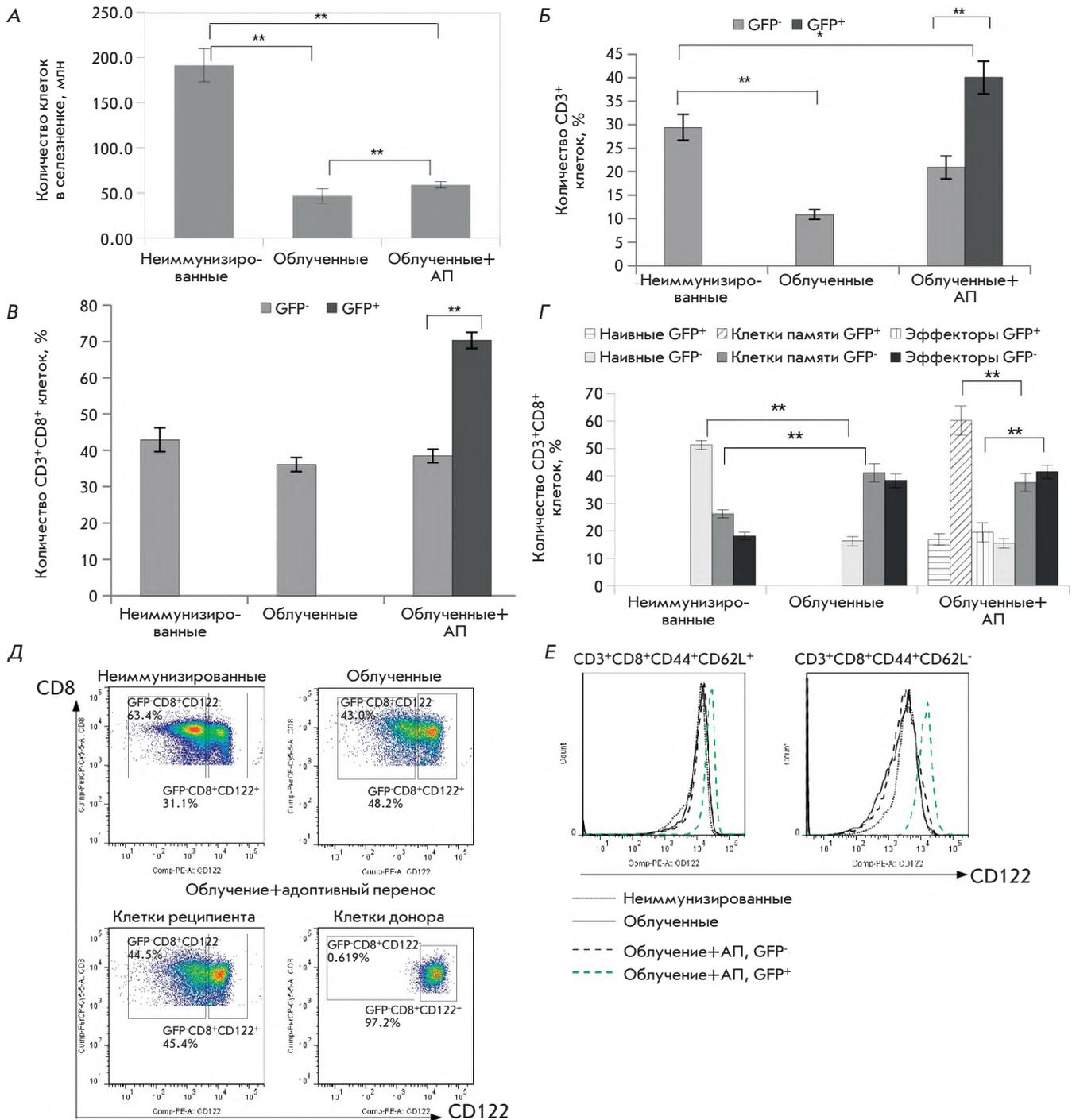


Рис. 4. Абсолютное количество клеток и профиль экспрессии активационных маркеров в популяции CD8⁺ Т-клеток донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻) у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. **А** – абсолютное количество лейкоцитов в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 6–9 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). **Б** – относительное количество CD3⁺ клеток в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). **В** – относительное количество CD3⁺CD8⁺ клеток в селезенке необлученных мышей (Не-

облученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (** $p \leq 0.01$). Г – относительное количество CD8⁺ Т-клеток с фенотипом наивных клеток (Naive, CD44⁺CD62L⁺), эффекторных клеток памяти (EM, CD44⁺CD62L⁻) и центральных клеток памяти (CM, CD44⁺CD62L⁺) в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (** $p \leq 0.01$). Д – относительное количество CD8⁺CD122⁺ Т-клеток в селезенке необлученных мышей (верхняя левая панель), мышей через 10 дней после сублетального облучения (верхняя правая панель) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (популяция лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента. Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Е – уровень экспрессии CD122 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ клеток (левая панель) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ клеток (правая панель) в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП; популяция лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания

ями в группах облученных и необлученных мышей (рис. 5А,Б). Уровень экспрессии CD5 в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ клеток был сопоставимым во всех экспериментальных группах (рис. 5В).

В отдельных работах обнаружены супрессорные функции CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} Т-клеток [18]. Мы оценили экспрессию маркера CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺) в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 5Г,Д,Е). Практически 100% донорских CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов приобрели фенотип CD49d^{hi} (рис. 5Г,Д), при этом соотношение CD49d^{low}/CD49d^{hi} клеток среди CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов реципиента было таким же, как в этой популяции Т-клеток облученных и необлученных мышей (рис. 5Г,Д). Выявлено значительное повышение уровня экспрессии данного маркера в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ донорских GFP⁺ CD8⁺ Т-клеток (рис. 5Е).

Кроме того, более 85% донорских CD8⁺CD44⁺ Т-клеток имели фенотип CXCR3⁺ (рис. 5Ж,З). Уровень экспрессии CXCR3 в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ был сопоставимым во всех экспериментальных группах, а в субпопуляции донорских CD44⁺CD62L⁻ Т-клеток он соответствовал значениям в группе необлученных животных (рис. 5И).

Таким образом, при адоптивном переносе сингенных спленоцитов реципиенту с лимфопенией наблюдается преимущественная гомеостатическая пролиферация CD8⁺ клеток донора, большая часть которых приобретает фенотип клеток памяти CD44⁺CD62L⁺, при этом большинство донорских CD44⁺ Т-клеток имеет фенотип CD122⁺CD5⁺CD49d^{hi}CXCR3⁺.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что нет строгой корреляции между поверхностным фено-

типом и функциональными свойствами Т-клетки памяти (способность к длительному самоподдержанию, устойчивость к апоптозу, упрощенные условия активации, усиленная пролиферация и приобретение эффекторных функций в ответ на специфический антиген). Известно, что популяция CD8⁺CD44⁺CD62L⁺CD122⁺ клеток может проявлять иммуносупрессорные свойства [13, 16–18, 20]. Для этой популяции характерны высокий уровень экспрессии рецептора хемокинов CXCR3 [17] и низкий – молекулы CD49d (CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}) [18]. Аналогичные популяции супрессорных CD8⁺ Т-клеток обнаружены у человека [21].

Мы показали, что адоптивный перенос сингенных лимфоцитов облученным мышам приводит к подавлению иммунного ответа на аллоантигены и бактериальные патогены. Данный эффект может быть обусловлен гомеостатической пролиферацией клонов Т-клеток, отличных от клонотипов, вовлеченных в эти иммунные ответы. Это подтверждается тем, что сниженный ответ *ex vivo* на аллоантигены наблюдался у Т-лимфоцитов облученных мышей независимо от адоптивного переноса спленоцитов неиммунизированных или иммунизированных мышей (рис. 2Б).

Лимфопения может индуцировать гомеостатическую пролиферацию потенциально аутореактивных клонов. Стоит особо отметить, что в наших исследованиях практически все донорские CD8⁺CD44⁺ Т-клетки экспрессировали маркер CD5. В ряде работ показано, что уровень экспрессии CD5 коррелирует с аффинностью Т-клеточного рецептора (ТКР) к собственными МНС/пептидным комплексам [22–24]. Взаимодействие Т-клеток с собственными МНС необходимо для их пролиферации в условиях лимфопении [25, 26], и Т-лимфоциты с самым высоким уровнем экспрессии CD5 (т.е., наивные Т-клетки) об-

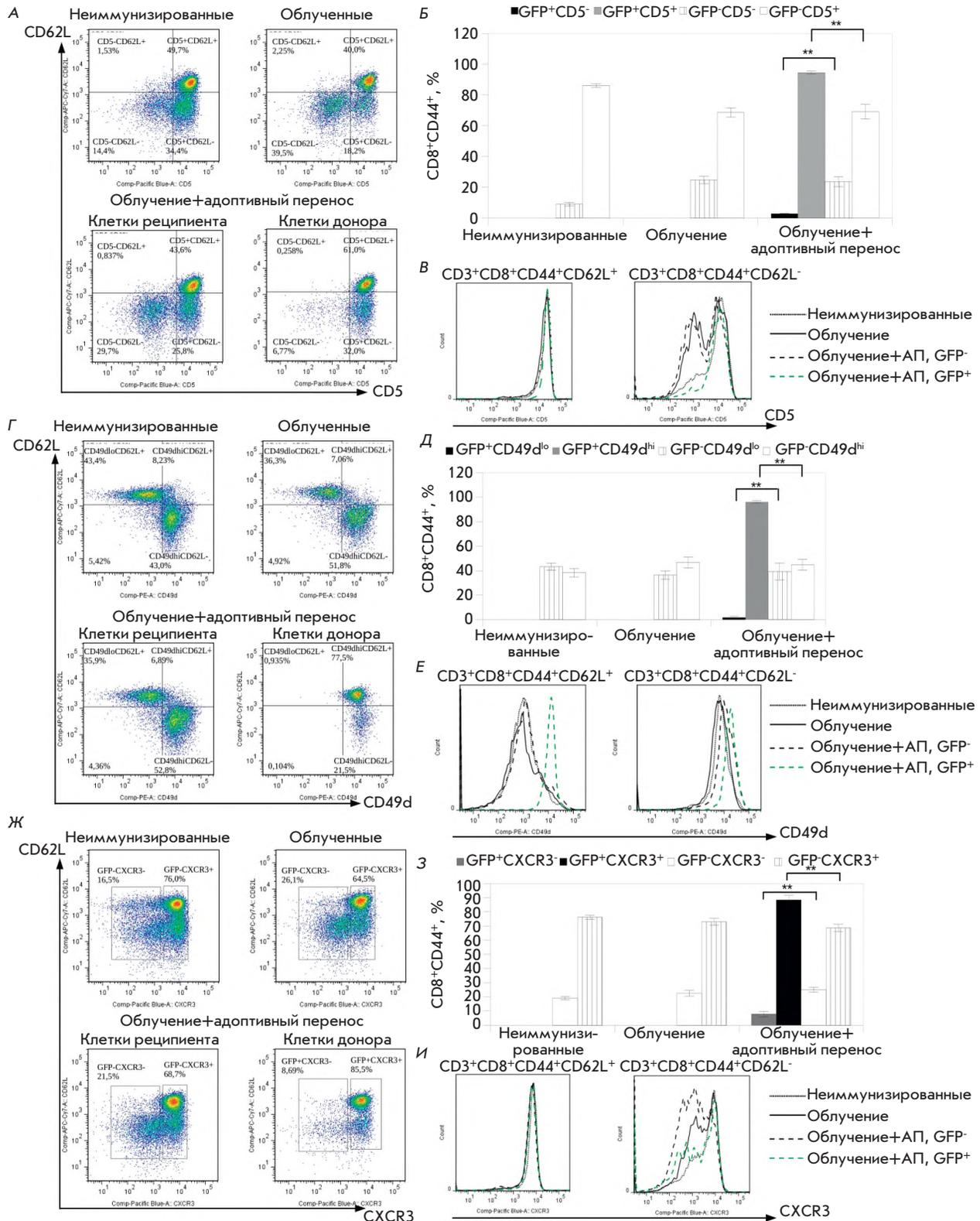


Рис. 5. Относительное количество и профиль экспрессии маркеров CD49d, CD5 и CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). А – профиль экспрессии CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей (верхняя левая панель), Облученных мышей (верхняя правая панель) и Облученных мышей + АП (среди лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного

репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. *Б* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипов CD5^{low} и CD5^{hi} в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *В* – профиль экспрессии CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. *Г* – профиль экспрессии CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей (левая верхняя панель), Облученных мышей (верхняя правая панель) и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. *Д* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипом CD49d⁻ и CD49d⁺ в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *Е* – профиль экспрессии CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. *Ж* – профиль экспрессии CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. *З* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипом CXCR3⁻ и CXCR3⁺ в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *И* – профиль экспрессии CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей на группу. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания

ладают наибольшим потенциалом гомеостатической пролиферации [3]. Таким образом, наивные Т-клетки могут служить основным источником суррогатных клеток памяти (T_{ML}) при лимфопении [15, 27]. В соответствии с этими данными, в нашем исследовании наблюдалось повышенное относительное количество донорских CD8⁺CD44⁺CD62L⁺CD5⁺ Т-клеток, в 1.5 раза превышающее это значение во всех контрольных группах (рис. 5А,Б).

Наивные Т-лимфоциты обладают высокой радиочувствительностью [28], и полное облучение организма может сократить пул данных клеток (рис. 4Г). Поэтому мы предполагаем, что в условиях лимфопении в отсутствие конкуренции за собственные МНС/пептидные комплексы адаптивно перенесенные донорские наивные Т-клетки быстро получают тонические сигналы для пролиферации [29, 30] и приобретают фенотип центральных клеток памяти (рис. 4Г). Таким образом, в условиях лимфопении приобретение Т-лимфоцитом фенотипа клеток памяти может быть следствием взаимодействия ТКР с МНС/пептидными комплексами и гомеостатической пролиферации, а не отображением истинного антигенного опыта этого Т-лимфоцита. Так, ранее мы показали, что у мышей, трансгенных по β-цепи ТКР, Т-лимфоциты, несущие трансгенную β-цепь ТКР, преимущественно имеют фенотип наивных клеток из-за значительной конкуренции за взаимо-

действие с собственными комплексами МНС/пептид, а Т-клетки с эндогенными β-цепями ТКР обладают фенотипом эффекторов и клеток памяти вследствие избытка лигандов, доступных для распознавания [31].

Интересно, что в реципиенте с лимфопенией донорские CD8⁺ Т-клетки приобретают фенотип, значительно отличающийся от фенотипа CD8⁺ лимфоцитов хозяина. CD8⁺ Т-клетки составляют 70% донорских CD3⁺ лимфоцитов и имеют преимущественно фенотип центральных клеток памяти CD44⁺CD62L⁺. Кроме того, практически все CD8⁺ лимфоциты донора являются CD49d^{hi} и экспрессируют CD122. При этом уровень экспрессии этих маркеров в популяции донорских CD44⁺CD62L⁺ клеток значительно превышает значения в соответствующей популяции CD8⁺ лимфоцитов реципиента.

Таким образом, нами показано, что при гомеостатической пролиферации в облученном организме донорские CD8⁺ Т-клетки приобретают фенотип CD44⁺CD62L⁺ CD122⁺CD49d^{hi}, который сочетает фенотипические характеристики истинных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺CD49d^{hi}) и супрессорных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD44⁺CD62L⁺CD122⁺) [18]. Более того, донорские Т-клетки также экспрессируют рецептор хемокинов CXCR3 – еще один маркер супрессорных CD8⁺CD122⁺ клеток [17]. Учитывая полученные данные, мы предполагаем, что в условиях лимфопении при адаптивном переносе сингенных лимфоцитов мо-

жет формироваться уникальная популяция донорских CD8⁺ клеток с супрессорной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе получено новое подтверждение того, что экспрессия CD44 на поверхности Т-клеток не всегда отображает их истинный антигенный опыт и не обязательно приводит к приобретению функциональных свойств истинных Т-клеток памяти. Следовательно, некорректно идентифицировать популяцию CD8⁺ клеток памяти исключительно по их поверхностному фенотипу без проведения подтверждающих функциональных тестов. В данной работе при адоптивном переносе сингенных лимфоцитов в облученный организм с лимфопенией происходила конверсия донорских CD8⁺ Т-клеток в T_{ML}-клетки, которые сочетали фенотипические характеристики истинных клеток памяти и супрессорных CD8⁺ Т-лимфоцитов. При этом наблюдалось значительное ухудшение функционального состояния иммунной системы реципиента, Т-лимфоциты которого слабо отвечали на аллоантигены и бактериальные антигены. Показано, что в организме человека существуют T_{ML} CD8⁺ Т-клетки [32] и супрессорные CD8⁺CD44⁺CXCR3⁺ Т-лимфоциты

[17]. Таким образом, проведение адоптивного переноса с целью восстановления клеточности периферических лимфоидных органов может иметь клинически неблагоприятный побочный эффект – повышение предрасположенности или чувствительности к инфекционным заболеваниям вследствие ухудшения иммунного ответа на антигены. ●

Данное исследование проведено при финансовой поддержке Мегагранта (договор № 14.W03.31.0020 между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт биологии гена» Российской академии наук). Работу проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБУН ИБГ РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы выражают благодарность Нестеренко Л.М. и Ермолаевой С.А. (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва) за предоставление вирулентных штаммов сальмонеллы и листерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang Q., Lakkis F.G. // Front. Immunol. 2015. V. 5. P. 504–509.
- Haluszczak C., Akue A.D., Hamilton S.E., Johnson L.D.S., Pujanauski L., Teodorovic L., Jameson S.C., Kedl R.M. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. № 2. P. 435–448.
- White J.T., Cross E.W., Kedl R.M. // Nat. Rev. Immunol. 2017. V. 17. № 6. P. 391–400.
- Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., Chen J. // J. Exp. Med. 2000. V. 192. P. 549–556.
- Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., Bevan M.J. // J. Exp. Med. 2000. V. 192. P. 557–564.
- Murali-Krishna K., Ahmed R. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2000. V. 165. P. 1733–1737.
- Jameson S.C., Lee Y.J., Hogquist K.A. // Adv. Immunol. 2015. P. 173–213.
- Ge Q., Hu H., Eisen H.N., Chen J. // Microbes Infect. 2002. V. 4. P. 555–558.
- Tanchot C., Le Campion A., Martin B., Léaument S., Dautigny N., Lucas B. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2002. V. 168. P. 5042–5046.
- Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2008. V. 180. P. 3910–3918.
- Oghumu S., Terrazas C.A., Varikuti S., Kimble J., Vadia S., Yu L., Seveau S., Satoskar A.R. // FASEB J. 2015. V. 29. P. 1019–1028.
- Cheung K.P., Yang E., Goldrath A.W. // J. Immunol. 2009. V. 183. P. 3364–3372.
- Wang L.-X., Li Y., Yang G., Pang P., Haley D., Walker E.B., Urba W.J., Hu H.-M. // Eur. J. Immunol. 2010. V. 40. P. 1375–1385.
- Le Campion A., Gagnerault M.-C., Auffray C., Becourt C., Poitrasson-Riviere M., Lallemand E., Bienvenu B., Martin B., Lepault F., Lucas B. // Blood. 2009. V. 114. P. 1784–1793.
- White J.T., Cross E.W., Burchill M.A., Danhorn T., McCarter M.D., Rosen H.R., O'Connor B., Kedl R.M. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11291.
- Suzuki H., Shi Z., Okuno Y., Isobe K. // Hum. Immunol. 2008. V. 69. P. 751–754.
- Liu J., Chen D., Nie G.D., Dai Z. // Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 494.
- Akanea K., Kojimab S., Mak T.W., Shikud H., Suzuki H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 9. P. 2460–2465.
- Hickman S.P., Turka L.A. // Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 2005. V. 360. № 1461. P. 1713–1721.
- Wan N., Dai H., Wang T., Moore Y., Zheng X.X., Dai Z. // J. Immunol. 2008. V. 180. № 1. P. 113–121.
- Shi Z., Okuno Y., Rifa'i M., Endharti A.T., Akane K., Isobe K., Suzuki H. // Eur. J. Immunol. 2009. V. 39. № 8. P. 2106–2119.
- Mandl J.N., Monteiro J.P., Vriskoop N., Germain R.N. // Immunity. 2013. V. 38. P. 263–274.
- Persaud S.P., Parker C.R., Lo W.L., Weber K.S., Allen P.M. // Nat. Immunol. 2014. V. 15. P. 266–274.
- Fulton R.B., Hamilton S.E., Xing Y., Best J.A., Goldrath A.W., Hogquist K.A., Jameson S.C. // Nat. Immunol. 2015. V. 16. № 1. P. 107–117.
- Goldrath A.W., Bevan M.J. // Immunity. 1999. V. 11. P. 183–190.
- Kieper W.C., Jameson S.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13306–13311.
- Sosinowski T., White J.T., Cross E.W., Haluszczak C., Marrack P., Gapin L., Kedl R.M. // J. Immunol. 2013. V. 190. P. 1936–1947.
- Yao Z., Jones J., Kohrt H., Strober S. // J. Immunol. 2011. V. 187. P. 4100–4108.
- Cho J.H., Kim H.O., Surh C.D., Sprent J. // Immunity. 2010. V. 32. P. 214–226.
- Takada K., Jameson S.C. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. P. 2253–2269.
- Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С., Хромых Л.М., Дейкин А.В., Ермолаевич Т.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 5. С. 714–726.
- van Kaer L. // Eur. J. Immunol. 2015. V. 45. P. 1916–1920.

УДК 571.27

Особенности презентации энцефалитогенного пептида МВР комплексами HLA-DR, обуславливающими протективность и предрасположенность к рассеянному склерозу

А. Э. Мамедов^{1*}, И. Н. Филимонова¹, И. В. Смирнов^{1,2}, А. А. Белогулов^{1,3}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: bioaz12@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2020

Принята к печати 05.08.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11008

РЕФЕРАТ Предрасположенность к рассеянному склерозу (РС), хроническому аутоиммунному заболеванию центральной нервной системы, определяется различными факторами, среди которых одним из важнейших считается генетическая компонента. Наибольший вклад в развитие РС вносят гены HLA класса II. В качестве одного из главных генетических факторов, предрасполагающих к РС, рассматривается группа аллелей HLA-DRB1*15. Показано, что в русской популяции группа аллелей HLA-DRB1*01 обладает протективным эффектом в отношении данного заболевания. Нами проведено сравнение связывания энцефалитогенного фрагмента основного белка миелина (МВР) двумя комплексами HLA-DR, которые обуславливают протективное действие и предрасположенность к РС: HLA-DR1 (HLA-DRB1*0101) и HLA-DR15 (HLA-DRB1*1501) соответственно. Показано, что миелиновый пептид МВР⁸⁸⁻¹⁰⁰ связывается с HLA-DR1 со скоростью, практически на порядок меньшей по сравнению с вирусным пептидом гемагглютинаина (НА), а также с МВР⁸⁵⁻⁹⁷ и вирусным рр65 в контексте HLA-DR15. Строение С-концевой части пептида играет ключевую роль в связывании с HLA-DR1 при одинаково высокоаффинных N-концевых частях пептидов. IC₅₀ миелинового пептида МВР⁸⁸⁻¹⁰⁰ при конкуренции с вирусным НА за связывание с HLA-DR1 практически на порядок больше, чем с НА, а также с МВР⁸⁵⁻⁹⁷ и вирусным рр65 в контексте HLA-DR15. Таким образом, аутоантигенный пептид МВР не способен конкурировать с вирусным пептидом за связывание с протективным HLA-DR1, однако этот миелиновый фрагмент более конкурентоспособен, чем вирусный пептид в случае связывания с HLA-DR15.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рассеянный склероз, HLA-DR, протективный аллель, аллель риска, пептид МВР, вирусный пептид.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HLA – лейкоцитарный антиген человека; МВР – основной белок миелина; PBS – фосфатно-солевой буфер; TRX – тиоредоксин; АПК – антигенпрезентирующие клетки; ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РС – рассеянный склероз.

ВВЕДЕНИЕ

Гены лейкоцитарного антигена человека (HLA) кодируют белки, которые способны связывать и представлять антигенные пептиды и, следовательно, играют критическую роль в иммунном ответе на патогены, а также в аутоиммунитете [1]. Связывание антиген-

ных пептидов с молекулами HLA класса II приводит к образованию бинарных комплексов пептид-HLA, представляемых на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) для распознавания рецепторами CD4 Т-клеток [2]. Новосинтезированные белки HLA защищены инвариантной цепью от агрегации

[3]. В эндосомальном компартменте инвариантная цепь частично деградирует, оставляя пептид CLIP в бороздке связывания [4, 5]. Далее CLIP может обмениваться на антигенные пептиды, которые образуются в результате процессинга антигенов в эндосомах. Процесс обмена ускоряется белком HLA-DM [6]. Наконец, комплекс пептид-HLA транспортируется на поверхность АПК для узнавания CD4 Т-клетками. Механизмы презентации пептидов молекулами HLA класса II хорошо изучены [7], однако, каким образом формирование и презентация комплексов аутоантиген-HLA приводят к развитию аутоиммунных реакций до сих пор не установлено и остается предметом большого интереса. Таким образом, идентификация комплексов аутопептид-HLA, связанных с аутоиммунными реакциями, может дать ключ к пониманию патогенеза аутоиммунных заболеваний [8–10].

Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, для которого характерны воспаление, демиелинизация и нейродегенерация [11]. Природа генетической предрасположенности к РС сложна и зависит от взаимодействия между множественными генетическими и эпигенетическими факторами, а также факторами окружающей среды [12]. Считается, что гены области HLA вносят большой вклад в риск развития РС [13]. Определенные аллели высокополиморфного гена HLA класса II – *DRB1*, по-видимому, являются значимой генетической детерминантой в патологии РС и могут влиять как на предрасположенность, так и на устойчивость к заболеванию [14]. Аллель *HLA-DRB1*1501* и связанный с ним гаплотип (*DQA1*0102, DQB1*0602, DRB1*1501, DRB5*0101*) известны как универсальный фактор риска развития РС с 1970-х годов. Анализ ассоциаций HLA с РС в популяциях Северной Европы выявил группы аллелей *HLA-DRB1 (DRB1*03, *01, *10, *11, *14, *08)*, которые коррелировали с заболеванием положительно или отрицательно [15]. Более того, идентифицированы аутоантигенные пептиды, презентуемые аллелями риска. *HLA-DRB1*1501* связывает фрагмент основного белка миелина (МВР), энцефалитогенный пептид *MBP₈₅₋₉₉* [8], тогда как *HLA-DRB5*0101* презентует пептид *MBP₈₆₋₁₀₅* [10]. Причем определены CD4 Т-клеточные клоны, распознающие эти комплексы пептид-HLA, связанные с заболеванием [16–18].

Ранее на репрезентативной когорте этнических русских пациентов с РС и условно здоровых людей показано, что группа аллелей *HLA-DRB1*01* связана с устойчивостью к РС, тогда как аллели *HLA-DRB1*15* положительно ассоциированы с заболеванием. Анализ взаимодействия белков, кодируемых аллелем риска *HLA-DRB1*1501* и протективным

аллелем *HLA-DRB1*0101*, с библиотекой МВР показал, что оба белка способны связывать миелиновый пептид *MBP₈₁₋₁₀₄* со сходной аффинностью [19]. Однако непонятно, каким образом связывание одного и того же миелинового фрагмента обеспечивает протективность в случае одного аллеля и предрасположенность к заболеванию в случае другого. Поэтому целью данного исследования было сравнение кинетических характеристик взаимодействия пептида *MBP₈₁₋₁₀₄* с протективным *HLA-DR1* и предрасполагающим *HLA-DR15* при РС, а также сравнение с их вирусными антигенными детерминантами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия и очистка белков

Рекомбинантные белки *HLA-DR1* (продукт генов *HLA-DRA1*0101* и *HLA-DRB1*0101*), *HLA-DR15* (продукт генов *HLA-DRA1*0101* и *HLA-DRB1*1501*) и *HLA-DM* получены с использованием методики, описанной ранее [20]. Пептид CLIP (*PVSKMRMATPLLMQA*) был связан ковалентно с N-концом β-цепей *HLA-DR1* и *HLA-DR15* через линкер с сайтом тромбина, по которому отрезали пептид для дальнейших экспериментов (1 ч, 20 U/мг, 25°C). Белки концентрировали в PBS и хранили при 4°C.

Слитые с тиоредоксином пептиды сконструированы и получены на основе созданной ранее библиотеки эпитопов МВР [21]. Генетические конструкции, кодирующие HA, pp65, миелиновые пептиды (*MBP₈₈₋₁₀₀* и *MBP₈₅₋₉₇*), МВР с точечными мутациями (*V86A, V87A, F89A, F90A*) и химерные пептиды (*HA-MBP, MBP-HA, pp65-MBP*), получены путем ПЦР с использованием библиотеки эпитопов МВР в качестве матрицы. В белковых конструкциях пептиды были слиты с C-концом бактериального тиоредоксина через гибкий линкер (*SGGGG*)₃S, несущий His-теги для очистки. Конструкцию, несущую только тиоредоксин с линкером (*TRX*), использовали в качестве отрицательного контроля. Все слитые с тиоредоксином пептиды получены с использованием методики, описанной ранее [21]. Пептиды химически биотинилировали с помощью *EZ-Link Sulfo-NHS-LC-биотина* (Thermo Fisher Scientific) в молярном соотношении 1 : 20 в течение 30 мин при 25°C. Белки концентрировали в PBS и хранили при -20°C.

Иммуноферментный анализ связывания пептидов HLA-DR

Биотинилированные пептид *MBP₈₁₋₁₀₄* и его варианты с точечными мутациями (*V86A, V87A, F89A, F90A*) (750 нМ) инкубировали в течение 18 ч при 37°C в 50 мкл PBS с *HLA-DR* с CLIP (*HLA-DR1*

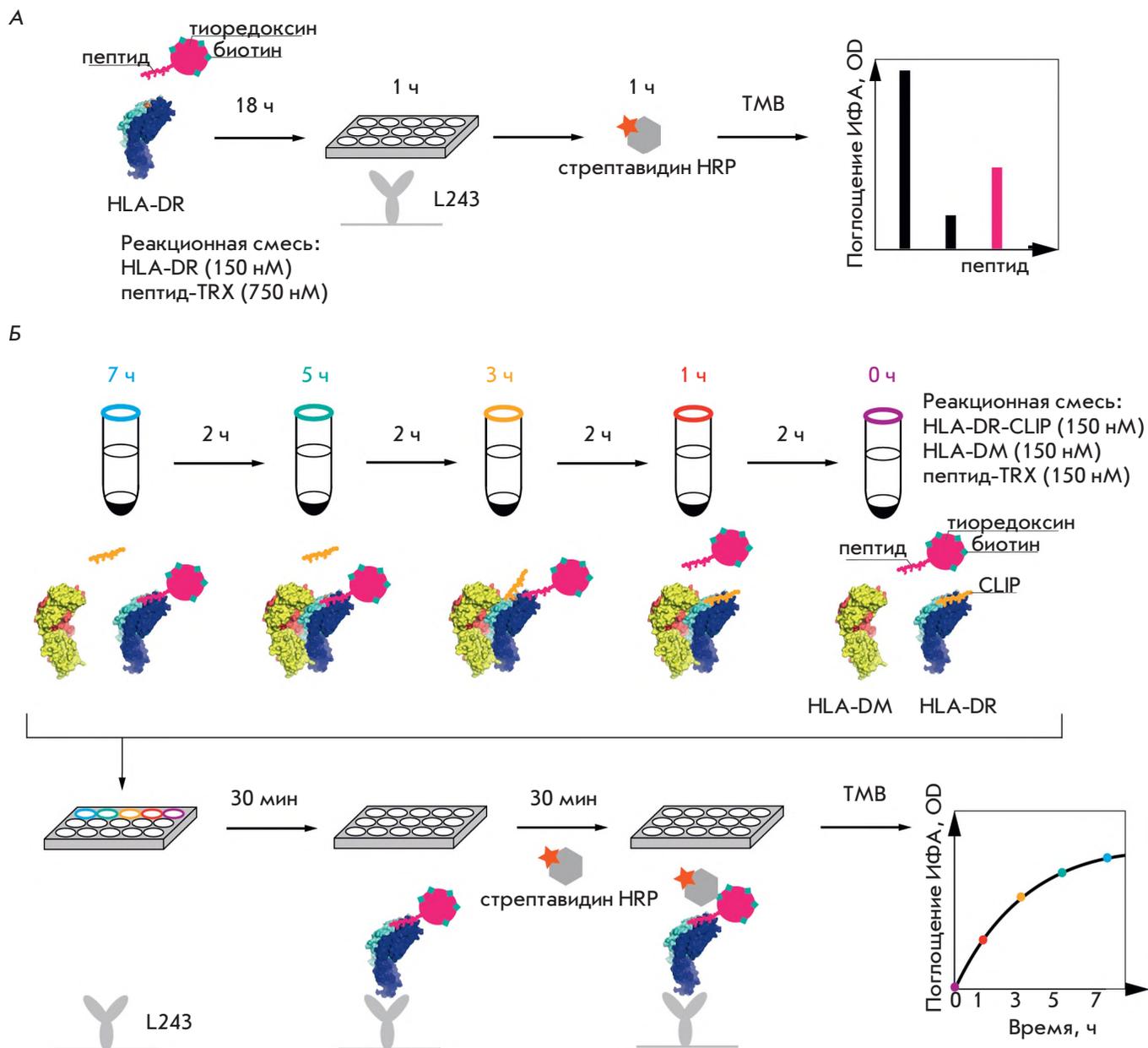


Рис. 1. Схемы иммуноферментного анализа связывания пептидов HLA-DR (А) и кинетики загрузки пептидов на HLA-DR (Б). Каждая из временных точек отмечена цветом. L243 – иммобилизованные в планшете моноклональные антитела к HLA-DR

или HLA-DR15) (150 нМ) (рис. 1А). Тиоредоксин с линкером (TRX) использовали в качестве отрицательного контроля. Комплексы DR–пептид затем добавляли к антителам L243 к HLA-DR, иммобилизованным в планшете и блокированным PBS с 2% обезжиренным сухим молоком. Связанный с HLA-DR биотинилированный пептид количественно определяли с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

В конкурентном анализе биотинилированные пептиды HA и pp65 (150 нМ) инкубировали с соответствующим HLA-DR (HLA-DR1 или HLA-DR15) (150 нМ) в присутствии небитинилированных HA, pp65, миелиновых пептидов (MBP₈₈₋₁₀₀ и MBP₈₅₋₉₇) или химерных пептидов (HA-MBP, MBP-HA, pp65-MBP) (в концентрациях 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 и 7.8 нМ) в течение 18 ч при 37°C в 50 мкл PBS. Эксперименты проводили в трех повторностях.

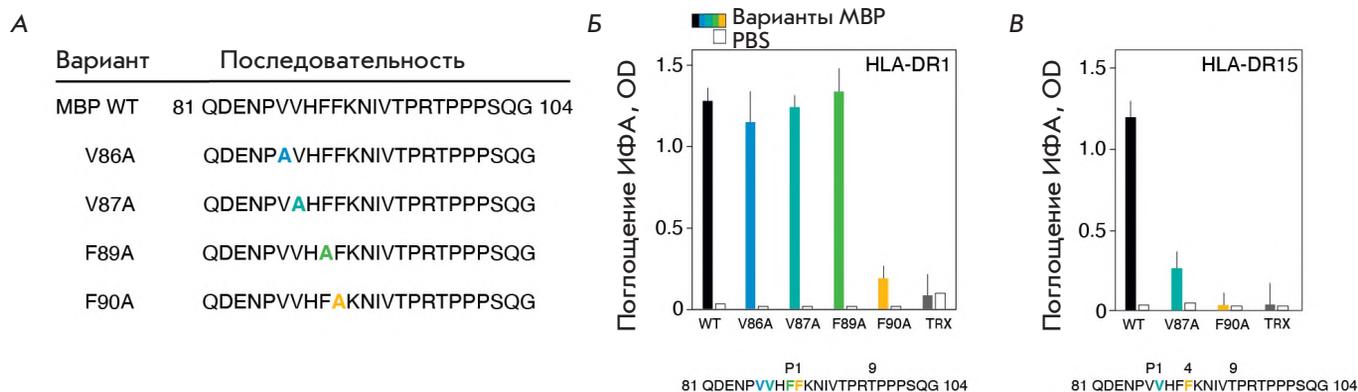


Рис. 2. А – последовательности пептида MBP₈₁₋₁₀₄ и его вариантов с точечными заменами аминокислот на аланин. Точечные замены обозначены разными цветами. Б, В – связывание пептида MBP₈₁₋₁₀₄ и его вариантов (750 нМ) с точечными заменами аминокислот на аланин с HLA-DR1 (Б) и HLA-DR15 (В) с CLIP (150 нМ). Цвета столбцов соответствуют цветам точечных замен. Белые столбцы представляют фоновый сигнал с PBS. Тиоредоксин с линкером (TRX) использовали в качестве отрицательного контроля. Стандартное отклонение отмечено

Иммуноферментный анализ кинетики загрузки пептидов на HLA-DR

Соответствующий HLA-DR с CLIP (HLA-DR1 или HLA-DR15) (150 нМ) инкубировали в присутствии HLA-DM (150 нМ) в 50 мкл цитратного буфера (50 мМ цитрат натрия, 150 мМ NaCl, pH 5.3) при 37°C с биотинилированными HA, pp65, миелиновыми пептидами (MBP₈₈₋₁₀₀ и MBP₈₅₋₉₇) или химерными пептидами (HA-MBP, MBP-HA, pp65-MBP) (150 нМ) в течение 7, 5, 3, 1 и 0 ч (рис. 1Б). Каждую временную точку смешивали отдельно, начиная с крайнего времени инкубации (7 или 5 ч), каждые 2 ч, после чего все временные точки вносили в планшет одновременно. ИФА проводили, как описывалось выше, лишь с той разницей, что время инкубации реакционных смесей в планшете и со стрептавидином было сокращено до 30 мин. Эксперименты проводили в трех повторностях. Анализ кинетических кривых проводили с применением модуля Enzyme Kinetics программы SigmaPlot (Sigma-Aldrich). Аппроксимации кривых связывания выполняли с помощью нелинейного приближения наименьших квадратов к модели связывания Ленгмюра, описывающей стехиометрию связывания 1 : 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение эпитопов MBP₈₁₋₁₀₄, распознаваемые HLA-DR1 и HLA-DR15

Нами проведено сравнение кинетических характеристик взаимодействия энцефалитогенного миелинового фрагмента MBP₈₁₋₁₀₄ с белками главного комплекса гистосовместимости II класса человека: протективным HLA-DR1 и предрасполагающим HLA-DR15 [19] в случае рассеянного склероза, а также с их анти-

генными детерминантами вирусного происхождения. Для осуществления данного анализа было необходимо первоначально определить связывающий эпитоп в составе MBP₈₁₋₁₀₄, распознаваемый HLA-DR1. Аланиновый скрин (замена гидрофобных и ароматических остатков на аланин, начиная с N-конца пептида (рис. 2А)) MBP₈₁₋₁₀₄ выявил остаток Phe в положении 90 в качестве гидрофобного якоря P1 (рис. 2Б); в свою очередь, это позволило предположить, что карманы P6/P7 и P9 в HLA-DR1, связанные с MBP₈₁₋₁₀₄, заняты остатками Thr, Pro и Thr в положениях 95, 96 и 98 соответственно. Эпитоп связывания MBP₈₁₋₁₀₄ с HLA-DR15, где Val87 и Phe90 находятся в положениях P1 и P4 соответственно [8], подтвержден с использованием соответствующих мутантных форм MBP₈₁₋₁₀₄ (рис. 2В).

Сравнение кинетики загрузки пептида MBP на HLA-DR1 и HLA-DR15

На следующем этапе изучена кинетика связывания HLA-DR1 с пептидами HA₃₀₆₋₃₁₃, MBP₈₈₋₁₀₀ и их химерными конструкциями MBP-HA и HA-MBP в присутствии HLA-DM, ускоряющего скорость обмена CLIP на изучаемый пептид (рис. 3Б). HA является фрагментом гемагглютинаина вируса гриппа – классической вирусной антигенной детерминантой для HLA-DR1 [22]. Для сравнения с аллелем риска HLA-DRB1*1501 также получены кинетические кривые связывания HLA-DR15 с пептидом pp65₁₀₉₋₁₂₃, который, в свою очередь, является фрагментом белка цитомегаловируса, вирусной детерминантой HLA-DR15 [23], миелиновым пептидом MBP₈₅₋₉₇ и химерной конструкцией pp65-MBP (рис. 3В). Важно отметить, что в химерных пептидах граница между N- и C-концевыми частями составляющих пептидов

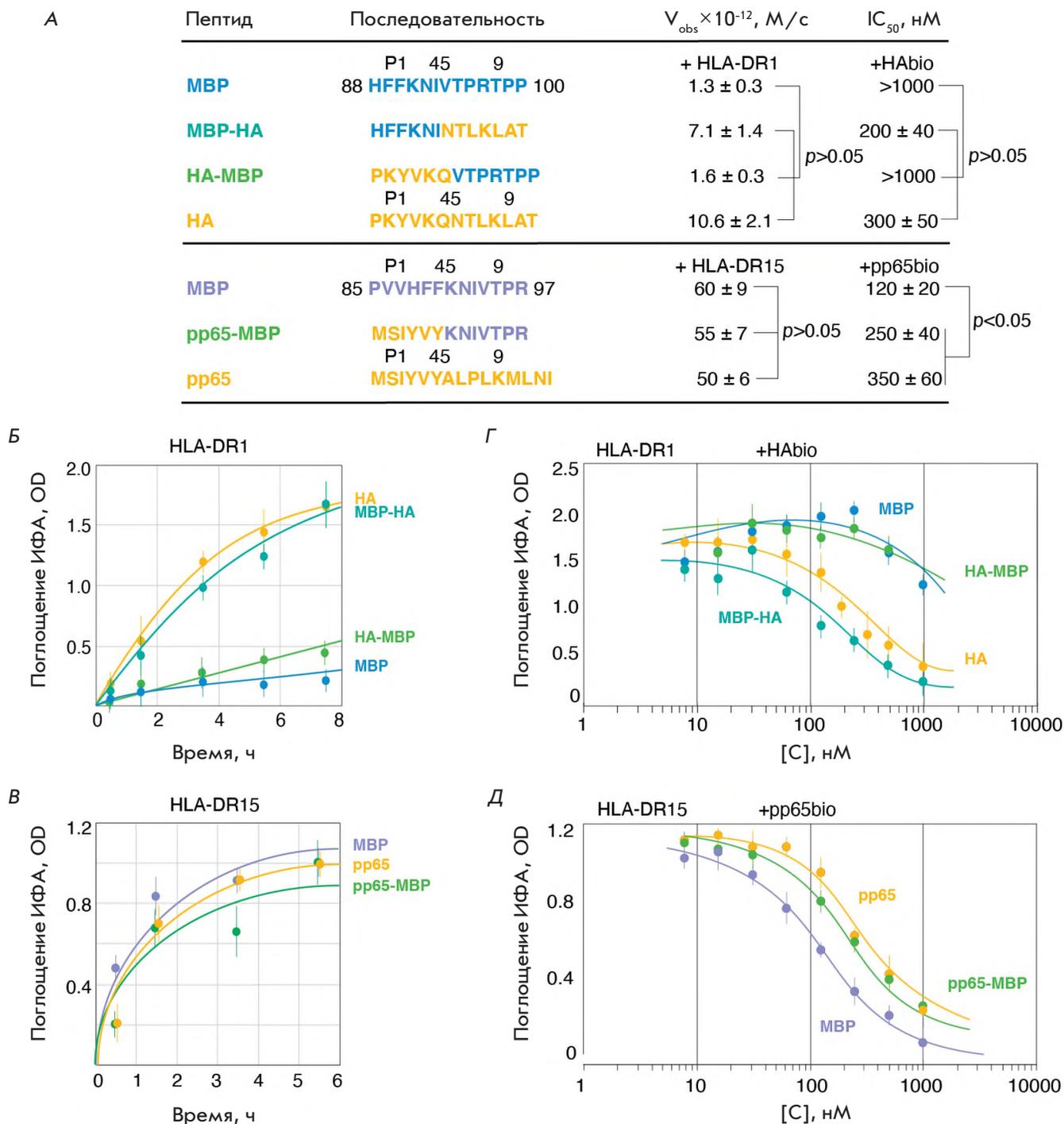


Рис. 3. А – последовательности пептидов MBP₈₈₋₁₀₀, MBP-HA, HA-MBP, HA, MBP₈₅₋₉₇, pp65-MBP и pp65. У химерных пептидов цветом отмечены части составляющих пептидов, а также положения аминокислотных остатков P1/4/5/9. Указаны значения начальной скорости взаимодействия каждого из пептидов с соответствующим HLA-DR1 или HLA-DR15 с CLIP, а также значения IC_{50} в конкуренции с соответствующим пептидом HAbio или pp65bio. Б, В – кинетика связывания биотинилированных пептидов MBP₈₈₋₁₀₀, MBP-HA, HA-MBP и HA (150 нМ) с предзагруженным CLIP HLA-DR1 (150 нМ) (Б) и биотинилированных пептидов MBP₈₅₋₉₇, pp65-MBP и pp65 (150 нМ) с предзагруженным CLIP HLA-DR15 (150 нМ) (В) в присутствии HLA-DM (150 нМ). Г, Д – конкурентное взаимодействие HLA-DR1 (150 нМ) с биотинилированным пептидом HAbio (150 нМ) (Г) и HLA-DR15 (150 нМ) с биотинилированным пептидом pp65bio (150 нМ) (Д) в присутствии возрастающих концентраций (7.8 нМ–1 мкМ) небитинилированных пептидов MBP₈₈₋₁₀₀, MBP-HA, HA-MBP и HA (Г), и MBP₈₅₋₉₇, pp65-MBP и pp65 (Д) в присутствии HLA-DM (150 нМ). Стандартное отклонение и значения p отмечены

проходила между аминокислотными остатками в положениях P4 и P5 (рис. 3А).

Известно, что вирусный пептид HA прочно связывается в пептидсвязывающей бороздке HLA-DR1 с высокой скоростью [24], поэтому в случае взаимодействия пептида HA с HLA-DR1 наблюдается выход кинетической кривой на плато уже в течение 8 ч (рис. 3Б). В то же время миелиновый пептид MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ связывается с HLA-DR1 со скоростью, практически на порядок меньшей по сравнению с вирусным пептидом. Таким образом, можно утверждать, что протективный HLA-DR1 кинетически различает экзогенный вирусный и эндогенный миелиновый антигены. Химерный пептид HA-MBP, содержащий N-концевую часть HA (306–311) и C-концевую часть MBP (94–100), связывается с HLA-DR1 с низкой скоростью, схожей с кинетикой взаимодействия с MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰. Однако в случае химерного пептида MBP-HA, состоящего из N-концевой части MBP (88–93) и C-концевой части HA (312–318), скорость связывания очень высокая, как и при связывании природного вирусного пептида HA. На основании полученных данных можно сделать вывод, что кинетические показатели связывания химерных пептидов с HLA-DR1 свидетельствуют о важности C-концевой части для эффективного взаимодействия с HLA-DR1 при одинаково высокоаффинных N-концевых частях пептидов. В изучаемых фрагментах N-концевые части содержат основной якорь в кармане связывания P1: ароматические остатки Tyr308 в случае HA и Phe90 в случае MBP. Можно предположить, что именно наличие Pro96 в C-концевой части пептидов MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ и химерного HA-MBP меняет положение пептида в борозде связывания из-за природной конформационной жесткости пролина, тем самым ухудшает взаимодействие пептида с карманом связывания P7. В случае пептидов HA и MBP-HA в положении 314 C-концевой части в кармане P7 находится гидрофобный аминокислотный остаток лейцина, благоприятствующий связыванию.

При анализе аллеля, обуславливающего риск возникновения РС, вирусный, миелиновый и химерный пептиды связываются с HLA-DR15 практически с одинаковой скоростью (рис. 3В). В отличие от HLA-DR1 у HLA-DR15 ключевым для связывания пептида является карман P4, куда идеально подходят ароматические аминокислотные остатки, а второстепенным – гидрофобный карман P1. Поэтому эффективность связывания вирусного, миелинового и химерного пептидов может быть объяснена благоприятными для взаимодействия пептидов с пептидсвязывающей бороздкой HLA-DR15 аминокислотными остатками, заполняющими важные для загрузки пептидов карманы P1 и P4:

Phe111 и Tyr114 в случае pp65, Val87 и Phe90 в MBP. Несмотря на то что вирусный пептид pp65 также содержит в C-концевой части пролин в кармане P7, он не уменьшает эффективность взаимодействия пептида с пептидсвязывающей бороздкой, так как в случае HLA-DR15 карманы P6/P7/P9 играют меньшую роль, чем P4. Разницу в скорости взаимодействия HA с HLA-DR1 и pp65 с HLA-DR15 (примерно в 5 раз) можно объяснить различиями в устройстве карманов данных комплексов HLA-DR и наличием якорных остатков в соответствующих пептидах (рис. 3А).

Сравнение скорости загрузки протективного HLA-DR1 и положительно ассоциированного с РС HLA-DR15 различными пептидами экзогенной и эндогенной природы может свидетельствовать о большей важности кинетической, а не термодинамической составляющей во взаимодействии комплекса MHC II с антигенами.

Сравнение конкурентной способности пептида MBP за связывание с HLA-DR1 и HLA-DR15

Принимая во внимание, что миелиновый пептид связывается и с HLA-DR1, и с HLA-DR15, хоть и с разной скоростью, на заключительном этапе оставался вопрос, способен ли он конкурировать за связывание с высокоаффинными вирусными антигенами. Для прояснения данного вопроса провели эксперименты по изучению конкурентного связывания пептидов HA, миелинового MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ и химерных HA-MBP и MBP-HA с HLA-DR1 в присутствии вирусного HA_{bio} (рис. 3Г), а также пептидов pp65, миелинового MBP⁸⁵⁻⁹⁷ и химерного pp65-MBP с HLA-DR15 в присутствии вирусного pp65_{bio} (рис. 3Д). Кинетические данные свидетельствуют, что эффективно конкурировать с вирусным HA_{bio} за связывание с HLA-DR1 способны HA и химерный пептид MBP-HA. Причем значимое падение сигнала ИФА при их добавлении начинается с концентрации, равной 30 нМ. В отличие от них добавление миелинового MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ и химерного HA-MBP незначительно понижает сигнал ИФА, начиная лишь с высокой концентрации (300 нМ) (рис. 3Г). IC₅₀ этих пар пептидов различаются практически на порядок, что говорит о неспособности миелинового пептида MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ эффективно конкурировать с вирусным HA за связывание с HLA-DR1 (рис. 3А). В случае HLA-DR15 снижение сигнала ИФА в реакциях конкуренции MBP⁸⁵⁻⁹⁷ и pp65 начинается с 30 нМ конкурирующего пептида pp65_{bio} (рис. 3Д) – аналогично взаимодействию пептида HA с HLA-DR1. При этом IC₅₀ пептида MBP⁸⁵⁻⁹⁷ приблизительно в 3 раза меньше, чем у pp65, таким образом, пептид MBP⁸⁵⁻⁹⁷ в отличие от MBP⁸⁸⁻¹⁰⁰ даже более конкурентоспособен, чем вирусный (рис. 3А).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных данных, можно предположить, что в отличие от HLA-DR15 фрагмент основного белка миеллина будет с низкой вероятностью представлен в комплексе с HLA-DR1 на поверхности антигенпрезентирующих клеток в достаточной плотности, необходимой для активации Т-клеточного ответа. По-видимому, протективные свойства аллеля HLA-DRB1*0101 могут быть связаны со способностью белкового продукта этого аллеля HLA-DR1 кинетически различать миелиновые и экзогенные пептиды. С другой стороны, предрасполагающий к РС HLA-DR15 способен эффективно представлять фрагмент MBP даже в конкуренции с экзоген-

ными пептидами, такими, как вирусный pp65. Наши данные позволяют считать, что один и тот же энцефалитогенный миелиновый фрагмент может презентироваться с абсолютно разной результирующей скоростью в зависимости от аллеля HLA-DR. Другими словами, иммуногенность компонентов миеллина при РС в большей степени может определяться не их доступностью для иммунных клеток, а, скорее, генетической предрасположенностью за счет носительства того или иного аллеля HLA-DR. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-74-30019 и гранта РФФИ ЕМБЛ_т № 18-54-74006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I., Chao N., Fronck Z., Jacob C.O., McDermott M., Sinha A.A., Timmerman L., Steinman L. // *Science*. 1988. V. 240. P. 1003–1009.
- Huppa J.B., Davis M.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. V. 3. № 12. P. 973–983.
- Cresswell P. // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. V. 12. P. 259–293.
- Ghosh P., Amaya M., Mellins E., Wiley D.C. *Nature*. 1995. V. 378. P. 457–462.
- Jasanoff A., Park S.J., Wiley D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. № 21. P. 9900–9904.
- Sherman M.A., Weber D.A., Jensen P.E. // *Immunity*. 1995. V. 3. № 2. P. 197–205.
- Roche P.A., Furuta K. // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. V. 15. № 4. P. 203–216.
- Smith K.J., Pyrdol J., Gauthier L., Wiley D.C., Wucherpfennig K.W. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 188. № 8. P. 1511–1520.
- Yin Y., Li Y., Mariuzza R.A. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 250. № 1. P. 32–48.
- Li Y., Li H., Martin R., Mariuzza R.A. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 304. № 2. P. 177–188.
- Hemmer B., Kerschensteiner M., Korn T. // *Lancet Neurol.* 2015. V. 14. № 4. P. 406–419.
- Sawcer S., Franklin R.J.M., Ban M. // *Lancet Neurol.* 2014. V. 13. № 7. P. 700–709.
- Canto E., Oksenberg J.R. // *Mult. Scler.* 2018. V. 24. № 1. P. 75–79.
- Zhang Q., Lin C.Y., Dong Q., Wang J., Wang W. // *Autoimmun. Rev.* 2011. V. 10. № 8. P. 474–481.
- Ramagopalan S.V., Ebers G.C. // *Genome Med.* 2009. V. 1. № 11. P. 1–5.
- Yin Y., Li Y., Kerzic M.C., Martin R., Mariuzza R.A. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 6. P. 1137–1148.
- Hahn M., Nicholson M.J., Pyrdol J., Wucherpfennig K.W. // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. № 5. P. 490–496.
- Li Y., Huang Y., Lue J., Quandt J.A., Martin R., Mariuzza R.A. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 2968–2979.
- Mamedov A.E., Zakharova M.Y., Favorova O.O., Kulakova O.G., Boyko A.N., Knorre V.D., Vorobieva N.A., Khurs E.N., Kiselev I.S., Baulina N.M., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 485. № 1. P. 115–118.
- Mamedov A.E., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Gabibov A.G. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. № 3. P. 442–446.
- Belogurov A.A., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avale B., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 2. P. 1258–1267.
- Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. // *Nature*. 1994. V. 368. № 6468. P. 215–221.
- Muixí L., Carrascal M., Alvarez I., Daura X., Martí M., Armengol M.P., Pinilla C., Abian J., Pujol-Borrell R., Jaraquemada D. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 1. P. 795–807.
- Yin L., Maben Z.J., Becerra A., Stern L.J. // *J. Immunol.* 2015. V. 195. № 2. P. 706–716.

УДК 577.25

Потенциалчувствительный домен из третьего повтора канала скелетных мышц человека $\text{Na}_v1.4$ – новая мишень действия «вольт-сенсорных» токсинов из ядов пауков

М. Ю. Мышкин¹, А. С. Парамонов¹, Д. С. Кульбацкий¹, Е. А. Суркова¹, А. А. Беркут¹,
А. А. Василевский¹, Е. Н. Люкманова^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}, З. О. Шенкарев^{1*}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

*E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020

Принята к печати 19.01.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11279

РЕФЕРАТ Потенциалзависимые натриевые каналы (Na_v) имеют модульное строение и содержат пять мембранных доменов. Центральный поровый домен отвечает за проводимость ионов и их селективную фильтрацию, а четыре периферических потенциалчувствительных домена (ПЧД-I/IV) отвечают за активацию и быструю инактивацию канала. «Вольт-сенсорные» токсины из яда членистоногих взаимодействуют с ПЧД, оказывая влияние на активацию и/или инактивацию канала, и могут выступать прообразом новых препаратов для лечения различных каналопатий и болевых синдромов. Токсинсвязывающие сайты, расположенные в ПЧД-I, II и IV Na_v -каналов млекопитающих, описаны ранее. На примере токсина Hm-3 из яда паука *Heriades melloteei* нами показано наличие токсинсвязывающего сайта в ПЧД-III $\text{Na}_v1.4$ -канала скелетных мышц человека. Разработана система бесклеточного синтеза белка, позволяющая получать препараты изолированного (отделенного от канала) ПЧД-III и его ¹⁵N-меченого аналога в миллиграммовых количествах. Методом ЯМР-спектроскопии в мембраноподобном окружении мицелл DPC/LDAO (1 : 1) показано, что Hm-3 имеет сравнительно высокое сродство к ПЧД-III (константа диссоциации комплекса $K_d \sim 6$ мкМ), сравнимое со сродством токсина к ПЧД-I и превышающее аффинность токсина к ПЧД-II. При образовании комплекса положительно заряженные остатки Lys25 и Lys28 токсина, по-видимому, взаимодействуют с внеклеточной петлей S1-S2 ПЧД-III. При этом молекула Hm-3 также контактирует с фрагментом липидной мембраны, окружающей канал.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бесклеточный синтез белка, взаимодействие лиганд-рецептор, ЯМР-спектроскопия, натриевые каналы, «вольт-сенсорные» токсины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DPC – додецилфосфохолин; LDAO – N,N-диметилдодециламин-N-оксид; Na_v – потенциалзависимый натриевый канал; ПЧД – потенциалчувствительный домен; ПЧД-III – потенциалчувствительный домен из третьего повтора α -субъединицы канала $\text{Na}_v1.4$ человека; ТМ – трансмембранный; ТС – трансляционная смесь.

ВВЕДЕНИЕ

Потенциалзависимые Na^+ -каналы (Na_v) – трансмембранные (ТМ) белки, отвечающие за восходящую фазу потенциала действия в возбудимых клетках. Эти каналы состоят из порообразующей α -субъединицы, с которой ассоциированы регуляторные β -субъединицы (рис. 1А). α -Субъединица включает в себя четыре гомологичных повтора (I–

IV), каждый из которых содержит потенциалчувствительный домен (ПЧД, ТМ-сегменты S1–S4) и сегменты S5–S6, формирующие пору канала [1]. β -Субъединицы имеют один ТМ-сегмент и внеклеточный иммуноглобулиновый домен [2]. В геноме человека представлено 10 генов, кодирующих α -субъединицы Na_v , и четыре гена β -субъединиц. Канал $\text{Na}_v1.4$ экспрессируется в скелетных мышцах,

и мутации в гене его α -субъединицы (*SCN4A*) приводят к ряду врожденных заболеваний опорно-двигательного аппарата, таких, как миотония, парамитония, гиперкалиемический и гипокалиемический периодический паралич, миастения и миопатия [3].

Na_v являются мишенями для множества нейротоксинов из разных организмов. В ПЧД и поре канала идентифицировано как минимум восемь рецепторных сайтов связывания токсинов [4]. Во внеклеточных петлях ПЧД повторов II и IV идентифицированы два канонических сайта связывания токсинов пауков и скорпионов (рис. 1А) [5]. Токсины, действующие на ПЧД-IV (сайт 3), ингибируют инактивацию канала, а токсины, действующие на ПЧД-II (сайт 4), например, «вольт-сенсорные» токсины пауков, влияют на активацию канала [5]. Несмотря на то что внеклеточные интерфейсы ПЧД-I и III могут быть частично закрыты иммуноглобулиновыми доменами β -субъединиц [6, 7], эти домены, задействованные в активации канала, также могут содержать токсинсвязывающие сайты, доступные при некоторых патофизиологических состояниях. Например, показано [8], что некоторые токсины ингибируют активацию химерного канала $\text{K}_v2.1$, содержащего петли S3–S4 из ПЧД-I или III канала $\text{Na}_v1.2$, и при этом не ингибируют исходный канал $\text{K}_v2.1$. Поиск места связывания нейротоксинов в каналах эукариот методом сайт-направленного мутагенеза затруднен, так как α -субъединица Na_v содержит четыре ПЧД, каждый из которых может принимать участие в формировании отклика на действие токсина.

Ранее мы показали, что основным сайтом связывания токсина Hm-3 из яда паука *Heriades melloteei* в канале $\text{Na}_v1.4$ человека является внеклеточная петля S3–S4 ПЧД-I [9]. Кроме того, Hm-3 взаимодействует с внеклеточной петлей S1–S2 ПЧД-II, но со значительно меньшей аффинностью [10]. Токсин Hm-3 состоит из 35 аминокислотных остатков и при нейтральных pH имеет заряд +4. Вторичная структура Hm-3 включает в себя несколько β -поворотов и β -шпильку, сформированную остатками Cys23–Cys34. Пространственная структура Hm-3 стабилизирована тремя дисульфидными связями, формирующими так называемый «цистиновый узел» [11]. Несколько ароматических остатков образуют на поверхности Hm-3 гидрофобный кла-

стер. Пространственная структура Hm-3 стабилизирована тремя дисульфидными связями, формирующими так называемый «цистиновый узел» [11]. Несколько ароматических остатков образуют на поверхности Hm-3 гидрофобный кла-

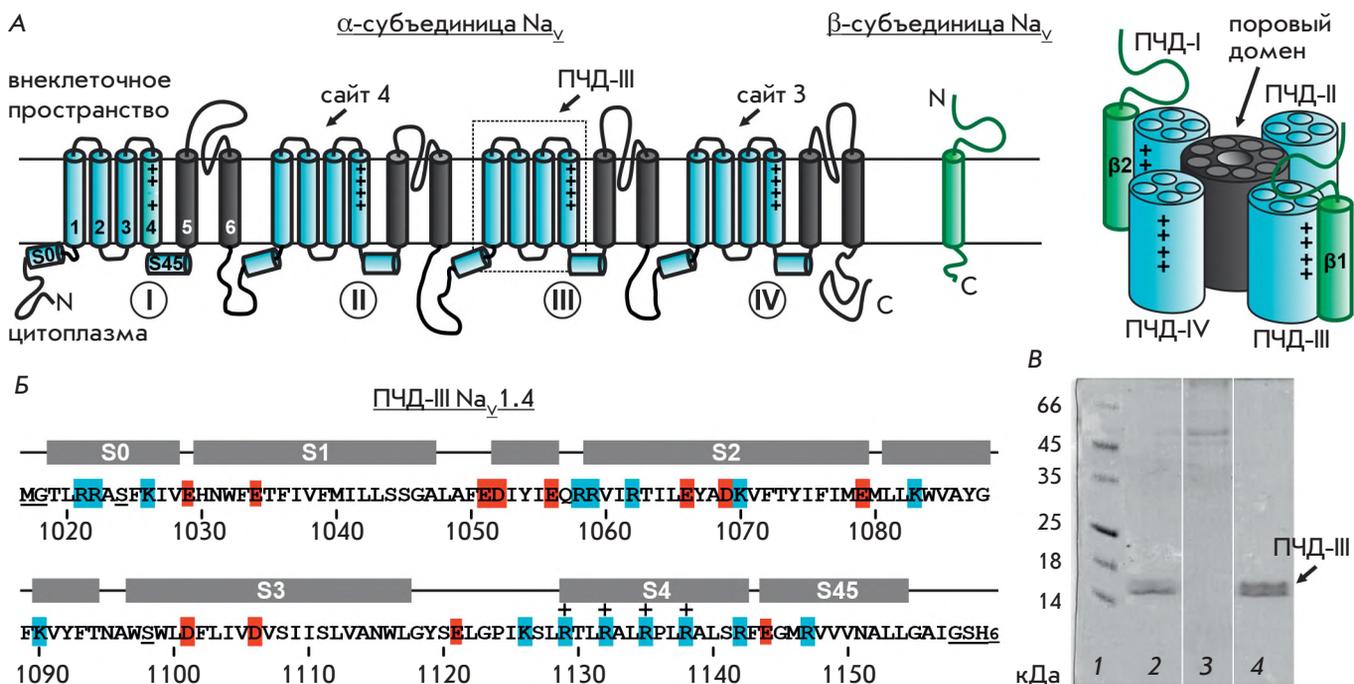


Рис. 1. Схематическое изображение пространственной организации Na_v эукариот в мембране (А). Аминокислотная последовательность варианта ПЧД-III, использованного в работе (Б). Подчеркнуты остатки, искусственно введенные в последовательность. Вторичная структура показана согласно известной пространственной структуре [6] (PDB ID: 6AGF). Отрицательно и положительно заряженные остатки обозначены красным и голубым фоном соответственно. Знаком «+» обозначены положительно заряженные остатки в спирали S4, служащей сенсором потенциала. Очистка образца ПЧД-III на Ni^{2+} -аффинной смоле (В). Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – солюбилизованный осадок ТС; 3 – промывка колонки; 4 – элюция 500-мМ имидазолом. Молекулярная масса ПЧД-III: 16.3 кДа

стер, поэтому, как и другие «вольт-сенсорные» токсины пауков, Hm-3 имеет сродство к мембранам [11] и, по-видимому, атакует ПЧД из мембраносвязанного состояния. Токсины этого семейства интересны не только как инструменты для структурно-функциональных исследований Na_v , но также могут служить прообразами новых лекарств. Например, Hm-3 способен блокировать аберрантные токи утечки (ω -токи), возникающие в канале $\text{Na}_v1.4$ при мутациях ПЧД-I и II, приводящих к развитию периодического паралича [9, 10].

В представленной работе на примере токсина Hm-3 нами впервые показано наличие токсинсвязывающего сайта в ПЧД-III канала $\text{Na}_v1.4$ человека. С этой целью мы использовали альтернативный подход, основанный на рекомбинантной продукции изолированного (отделенного от канала) ПЧД и анализе сайтов связывания методом ЯМР-спектроскопии. Возможность структурных ЯМР-исследований изолированных ПЧД [12] и их комплексов с токсинами [9, 10] показана ранее.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изолированный ПЧД-III (остатки 1019–1157, *рис. 1Б*) получали с помощью сопряженной бесклеточной системы синтеза диализного типа на основе экстракта S30 из *Escherichia coli*, используя протоколы, разработанные для других ПЧД [9, 10]. Генетическую конструкцию для синтеза ПЧД-III с С-концевым His6-тагом клонировали в плазмидный вектор pIVEX2.3d, обеспечивающий высокую эффективность бесклеточного синтеза. Последовательность ПЧД-III содержит два остатка Cys, не участвующих в образовании дисульфидных связей. Для уменьшения тенденции к агрегации рекомбинантного домена эти остатки были заменены на Ser (*рис. 1Б*, подчеркнуты). Бесклеточный синтез проводили без добавления мембраномоделирующих компонентов в трансляционную смесь (ТС). При этом синтезированный ПЧД-III накапливался в виде осадка с чистотой более 90% (*рис. 1В*). ^{15}N -меченый аналог ПЧД-III синтезировали с использованием обогащенной изотопом ^{15}N смеси 16 аминокислот (Cortecnet, Лез-Юлис, Франция), полученной из водорослей, и отдельных ^{15}N -меченых аминокислот Asn, Gln и Trp. Цистеин в реакцию синтеза не добавляли, так как использованный в работе вариант ПЧД-III не содержит этой аминокислоты. Выходы препаратов ПЧД-III немеченого и ^{15}N -меченого белка составили 0.5 и 0.35 мг на 1 мл ТС соответственно. Для ЯМР-исследования осадок, содержащий синтезированный ПЧД-III, растворяли в 10% растворе додецилфосфохолина (DPC), очищали с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии в присутствии 0.5% DPC (*рис. 1В*), переводили в це-

левой буфер (20 mM Трис-ацетат, pH 5.5) и добавляли детергент N,N-диметилдодециламин-N-оксид (LDAO) до молярного соотношения DPC/LDAO 1 : 1. Ранее эту мембраномоделирующую среду применяли для исследования комплексов ПЧД-I и II с токсином Hm-3 [9, 10]. Концентрацию детергентов контролировали по спектрам 1D ^1H -ЯМР. ЯМР-спектры получали на спектрометре AVANCE III 800 (Bruker).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий вид 2D ^1H , ^{15}N корреляционного ЯМР-спектра ПЧД-III (*рис. 2А*) соответствовал спектрам ПЧД-I и II, полученным ранее [9, 10]. Наблюдаемая небольшая дисперсия сигналов $^1\text{H}^{\text{N}}$ характерна для спиральных ТМ-белков. Однако в спектре наблюдалось не более 90 сигналов HN-групп основной цепи из 130–140 ожидаемых. В соответствующих областях спектра представлены шесть из восьми HN-сигналов остатков Gly и четыре из пяти сигналов HN^{e1} боковых цепей остатков Trp. Отсутствие части сигналов в спектре, а также неоднородная интенсивность и полуширина наблюдаемых сигналов указывают на процессы конформационного обмена в мкс-мс-диапазоне. Эти процессы связаны, вероятно, с пластичностью структуры ПЧД-III и динамикой контактов между ТМ-спиралями. Наблюдаемые уширения сигналов не позволили получить отнесение сигналов ЯМР ПЧД-III, поэтому взаимодействие с Hm-3 исследовали качественно, без картирования сайта связывания в ПЧД.

Образцы немеченого и ^{15}N -меченого Hm-3 получали, используя рекомбинантную продукцию в клетках *E. coli* [9, 11]. Для исследования взаимодействия ПЧД-III/Hm-3 в образец ^{15}N -меченого ПЧД в мицеллах DPC/LDAO поэтапно добавляли немеченый Hm-3 до молярного соотношения ПЧД/токсин 1 : 4. Концентрацию детергентов поддерживали постоянной, чтобы предотвратить изменение в распределении токсина между водной фазой и мицеллами. Согласно полученным ранее данным о взаимодействии Hm-3 с мицеллами DPC/LDAO [9], ~97% молекул токсина в условиях эксперимента были связаны с мицеллами. При добавлении токсина в спектре ПЧД-III наблюдались изменения химических сдвигов и амплитуд некоторых сигналов (*рис. 2Б*). Эти изменения указали на специфическое взаимодействие ПЧД/токсин. Обратимый процесс образования-диссоциации комплекса ПЧД/Hm-3 идет с характерным временем в мкс-мс-диапазоне, и для разных сигналов ПЧД этот обменный процесс является либо быстрым, либо промежуточным (по шкале времен ЯМР). Константу диссоциации комплекса определили путем аппроксимации зависимости химического сдвига сигналов ПЧД-III от концентрации Hm-3

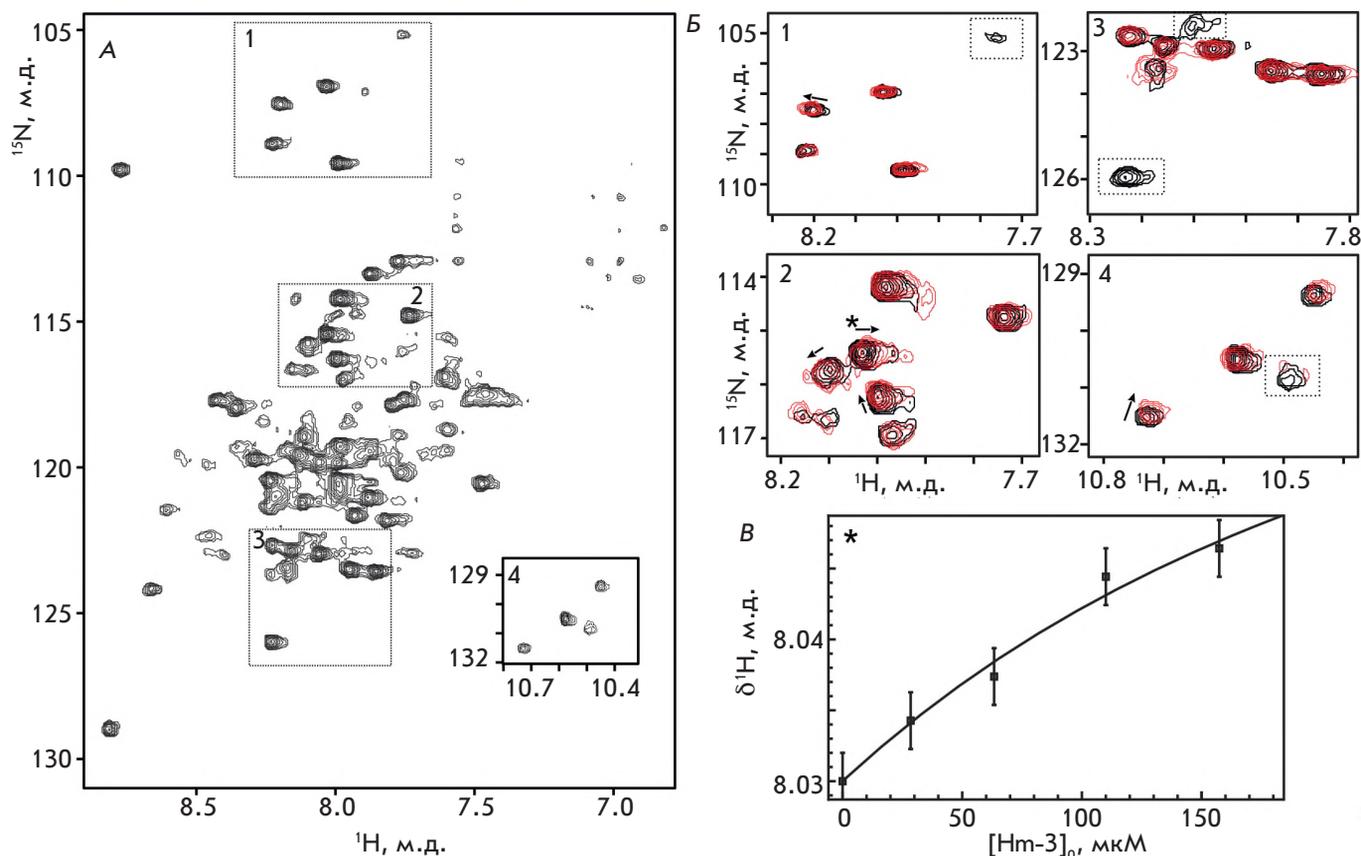


Рис. 2. ЯМР-исследование взаимодействия ^{15}N -меченого ПЧД-III с немеченым Hm-3. А – 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-спектр 43 мкМ ПЧД-III в мицеллах DPC/LDAO (45/45 мМ, 800 МГц, рН 5.5, 45°C). Б – наложение фрагментов спектров ПЧД-III, полученных без Hm-3 (черные контуры) и после добавления 160 мкМ Hm-3 (красные контуры). Стрелками показано направление изменения положения сигналов. Пунктирными линиями обозначены сигналы, «исчезающие» при добавлении токсина. В – изменение ^1H химического сдвига HN-сигнала при 8.03/115.4 м.д. (показан звездочкой на панели B2) аппроксимировано уравнением, описывающим связывание в присутствии избытка мицелл детергента

(рис. 2В), учитывая вклад взаимодействия Hm-3/мицелла [9]. Полученное значение (5.8 ± 3.8 мкМ) соответствовало константе диссоциации комплекса ПЧД-I/Hm-3 (6.2 ± 0.6 мкМ) [9] и было меньше значения для комплекса с ПЧД-II (~11 мкМ) [10], что указывает на более сильное взаимодействие токсина с ПЧД-I и ПЧД-III.

Обратное титрование, когда к образцу ^{15}N -меченого Hm-3 добавляли немеченый ПЧД-III, показало, что положительно заряженные остатки Lys25 и Lys28, находящиеся в β -шпильке токсина, а также остаток Phe12, заглубленный в гидрофобную область мицеллы, принимают участие в образовании комплекса с ПЧД (рис. 3). Этот сайт связывания совпадает с сайтами, ответственными за взаимодействие Hm-3 с ПЧД-I и II [9, 10]. В ходе этих более ранних исследований показано, что пара заряженных остатков Hm-3 – Lys25 и Lys28 – способна специфически взаимодействовать со спиральными мотивами, со-

держащими два отрицательно заряженных остатка (Asp или Glu), разделенных двумя или тремя незаряженными остатками. В последовательности ПЧД-III такие мотивы встречаются только во внеклеточной петле S1–S2 и в ТМ-части спирали S2 (рис. 1Б). Однако, согласно известной пространственной структуре канала $\text{Na}_v1.4$ человека [6], остатки Glu1066 и Asp1069 расположены глубоко в трансмембранной части спирали S2, а их боковые цепи обращены внутрь молекулы ПЧД-III. Учитывая амфипатические свойства Hm-3 [11], мы предполагаем, что токсин не может погружаться глубоко в мембрану и взаимодействовать с этими остатками. В то же время боковые цепи остатков Glu1051, Asp1052 и Glu1056, расположенных в петлевом участке S1–S2, доступны растворителю и могут взаимодействовать с молекулой Hm-3, связанной с поверхностью мембраны.

Напротив, другая внеклеточная петля ПЧД-III – S3–S4 – содержит только один отрицательно заря-

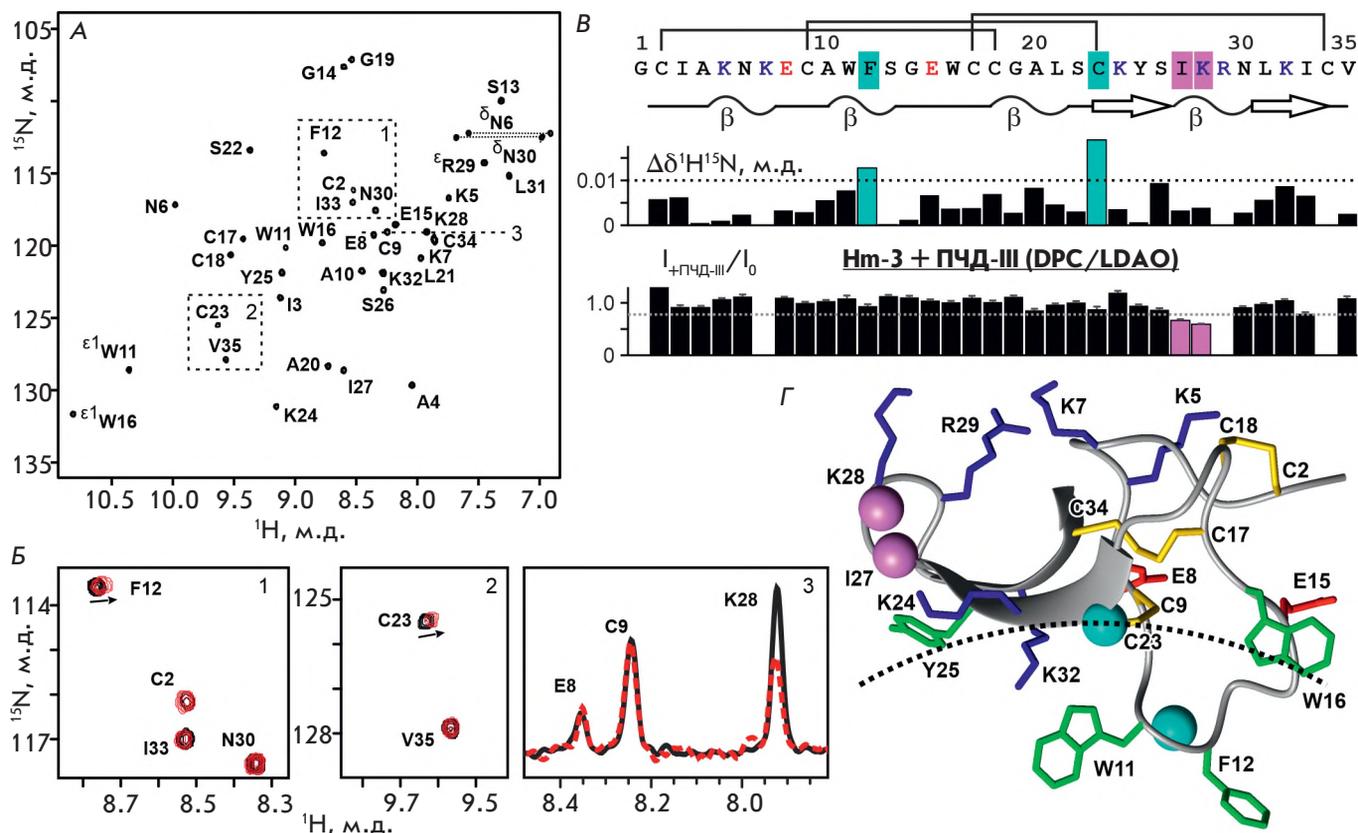


Рис. 3. ЯМР-исследование взаимодействия ^{15}N -меченого Hm-3 с немеченым ПЧД-III. А – 2D ^1H , ^{15}N -HSQC-спектр 30 мкМ Hm-3 в мицеллах DPC/LDAO (45/45 мМ, 800 МГц, pH 5.5, 45°C). Б – наложение фрагментов спектров Hm-3, полученных без ПЧД-III (черные контуры/линии) и после добавления 40 мкМ ПЧД-III (красные контуры/линии, конечное соотношение ПЧД-III/Hm-3 3 : 2). Стрелками показано направление изменения положения сигналов. На панели Б3 показано селективное уменьшение амплитуды сигнала Lys28 при добавлении ПЧД-III. В, Г – первичная, вторичная и пространственная структуры токсина Hm-3 [11] (PDB ID: 2MQU), а также изменение химических сдвигов и амплитуд сигналов Hm-3 при добавлении ПЧД-III. Показаны положительно и отрицательно заряженные остатки и дисульфидные мостики. Остатки, для которых наблюдаются значительные изменения, выделены фоном (Б) и обозначены шариками (Г). Пунктирной линией изображена поверхность мицеллы детергента [9]

женный остаток Glu1121 и, вероятно, не может выступать в качестве сайта связывания токсина Hm-3. Это согласуется с результатами предыдущего исследования химерного канала $\text{K}_{\text{v}}2.1$, содержащего петлю S3–S4, пересаженную из ПЧД-III канала $\text{Na}_{\text{v}}1.4$, в ходе которого не выявлено значимого взаимодействия с токсином Hm-3 [9]. Таким образом, полученные данные указывают на то, что внеклеточная петля S1–S2 ПЧД-III канала $\text{Na}_{\text{v}}1.4$ человека содержит сайт, способный взаимодействовать с «вольт-сенсорными» токсинами пауков. Следует отметить, что исследование токсинсвязывающих сайтов, которые располагаются на участке S1–S2 ПЧД каналов Na_{v} , с помощью химерных каналов, по-видимому, невозможно. Попытки пересаживать петли S1–S2 из различных каналов в $\text{K}_{\text{v}}2.1$ приводили к нефункциональным химерам [13].

Разработанная в настоящей работе система бесклеточного синтеза ПЧД-III позволит в дальнейшем исследовать взаимодействие домена и с другими токсинами, а также может быть использована для скрининга прототипов лекарственных препаратов, селективно взаимодействующих с ПЧД-III. Предложенный метод исследования фармакологических свойств изолированных ПЧД каналов Na_{v} с использованием спектроскопии ЯМР имеет преимущество перед методами, основанными на исследовании химерных каналов, так как позволяет, во-первых, картировать остатки токсинов, важные для взаимодействия с доменами, а во-вторых, изучать токсинсвязывающие сайты, которые располагаются не только в петле S3–S4, но и на участке S1–S2. ●

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10338.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Catterall W.A. // *J. Physiol.* 2012. V. 590. P. 2577–2589.
2. O'Malley H.A., Isom L.L. // *Annu. Rev. Physiol.* 2015. V. 77. P. 481–504.
3. Cannon S.C. // *Handbook Exp. Pharmacol.* 2018. V. 246. P. 309–330.
4. Xu L., Ding X., Wang T., Mou S., Sun H., Hou T. // *Drug Discov. Today*. 2019. V. 24. P. 1389–1397.
5. Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. // *Front. Pharmacol.* 2011. V. 2. P. 71.
6. Pan X., Li Z., Zhou Q., Shen H., Wu K., Huang X., Chen J., Zhang J., Zhu X., Lei J., et al. // *Science*. 2018. V. 362. P. eaau2486.
7. Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. // *Science*. 2019. V. 363. P. 1303–1308.
8. Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Swartz K.J. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 202–208.
9. Männikkö R., Shenkarev Z.O., Thor M.G., Berkut A.A., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Kulbatskii D.S., Kuzmin D.A., Sampedro Castañeda M., King L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. 4495–4500.
10. Myshkin M.Y., Männikkö R., Krumkacheva O.A., Kulbatskii D.S., Chugunov A.O., Berkut A.A., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Fedin M.V., Hanna M.G., et al. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 953.
11. Berkut A.A., Peigneur S., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tytgat J., Shenkarev Z.O., Vassilevski A.A. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 492–504.
12. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Shingarova L.N., Yakimov S.A., Dubinnyi M.A., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 5630–5637.
13. Alabi A., Bahamonde M., Jung H., Kim J.I., Swartz K.J. // *Nature*. 2007. V. 450. P. 370–375.

УДК 577.352.465

Новый модулятор активности STIM2-зависимых депо-управляемых кальциевых каналов

А. Ю. Скопин¹, А. Д. Григорьев¹, Л. Н. Глушанкова¹, А. В. Шалыгин¹, Г. Ванг², В. Г. Карцев³, Е. В. Казначеева^{1*}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Университет Сучжоу Колледж фармакологических наук, Сучжоу, Цзянсу, 215123 Китай

³ИнтерБиоСкрин (InterBioScreen Ltd.), Черноголовка, 142432 Россия

*E-mail: evkazn@incras.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020

Принята к печати 24.12.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11269

РЕФЕРАТ Депо-зависимый вход кальция – один из основных путей поступления кальция в электронезависимые клетки, вызывающий запуск множества внутриклеточных сигнальных каскадов. Белки семейства STIM (STIM1 и STIM2), ключевые в данном процессе, являются сенсорами кальция во внутриклеточных кальциевых депо, активирующими депо-управляемые каналы плазматической мембраны при снижении концентрации кальция. В физиологических условиях белки STIM1 и STIM2 управляют различными депо-зависимыми ионными каналами плазматической мембраны. Селективные модуляторы активности белков STIM на данный момент отсутствуют, а инструментарий по разграничению их активности в условиях эксперимента недостаточен. В результате скрининга библиотеки низкомолекулярных соединений нами обнаружено вещество 4-MPTC, селективно подавляющее STIM2-зависимый депо-управляемый вход кальция ($IC_{50} = 1$ мкМ), но практически не влияющее на STIM1-зависимый механизм активации депо-управляемых каналов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кальций, депо-управляемый вход, STIM1, STIM2, 2-APB, Orai.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 2-APB – 2-аминоэтоксидифенилборат; 4-MPTC – 4-метил-2-(2-пропилпиридин)-N-(пиридин)-тиазол-5-карбоксамид; CC1 – домен coiled-coil 1; DMSO – диметилсульфоксид; STIM – молекула стромального взаимодействия; SOAR – STIM-Orai-активирующий домен; Tg – тапсигаргин.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме – один из общих ответов клетки на внеклеточную стимуляцию мембранных рецепторов физиологически активными веществами, запускающими широкий спектр внутриклеточных каскадов. В физиологических условиях кальциевый ответ клетки на агонист включает в себя не только вход внеклеточного кальция в клетку, но и опустошение внутриклеточных депо, расположенных в эндоплазматическом ретикулуме [1]. Вход кальция в клетку через каналы плазматической мембраны в ответ на опустошение внутриклеточных депо или депо-управляемый вход кальция [2] обеспечивает существенную часть притока ионов кальция. Запускают этот вход белки STIM (STIM1 и STIM2) – сенсоры кальция в просвете эндоплазматического ретикулума. Первым был охарактеризован белок STIM1, основной активатор депо-управляемого входа [3, 4].

Белки STIM1 и STIM2 различаются сродством к ионам кальция и способностью к взаимодействию с каналами плазматической мембраны [5]. STIM2 более чувствителен к малым изменениям концентрации кальция в депо и является более слабым активатором депо-управляемого входа, чем STIM1. Вероятнее всего, STIM1 отвечает за кальциевый ответ клетки при поступлении внеклеточного сигнала, а STIM2 регулирует базальный уровень концентрации кальция в депо и цитозоле [6]. Кроме того, STIM2 способствует переходу STIM1 в активное состояние [7]. В физиологических условиях STIM1 и STIM2 активируют в клетке различные депо-управляемые каналы [8], которые сформированы белками семейств Orai [9, 10] и TRP [11–13]. Белки STIM вовлечены в широкий спектр патологических процессов. Например, при болезни Хантингтона [14, 15], болезни Альцгеймера [16, 17], церебральной ишемии [18] и черепно-мозговых травмах [19, 20] на фоне увеличенной активности

белков STIM наблюдается длительное повышение концентрации кальция в нейронах, приводящее к клеточной гибели. Изменение уровней экспрессии STIM характерно для нескольких типов рака молочной железы [21], карциномы толстой кишки [22]. Таким образом, изменение активности белков STIM, в частности, уменьшение активности STIM2, может вызывать потенциальный терапевтический эффект. В фундаментальных исследованиях модулятор активности белков STIM2 востребован как инструмент, дающий возможность разделить STIM1- и STIM2-зависимые сигнальные пути, поскольку подобные фармакологические инструменты на данный момент отсутствуют.

Исследователи активно применяют широкий спектр блокаторов депо-управляемого входа, большинство из них модулируют активность депо-зависимых каналов, но эти соединения зачастую недостаточно охарактеризованы и имеют несколько мишеней. Одно из наиболее часто применимых соединений 2-аминоэтоксидифенилборат (2-APB) впервые было охарактеризовано как блокатор IP_3 -индуцированного выброса кальция [23]. В настоящее время оно широко применяется как блокатор депо-управляемого входа при концентрациях более 50 мкМ. Кроме того, показано, что 2-APB в концентрации 5 мкМ может потенцировать депо-управляемый вход [24]. Механизм действия 2-APB не до конца изучен, известно, что это соединение действует на несколько мишеней и, в том числе, оказывает модулирующий эффект на активность различных каналов, например, образованных белками семейства TRPV [25, 26] и Orai3 [27]. 2-APB увеличивает также неспецифическую утечку кальция из просвета эндоплазматического ретикулума [28].

При заполненном кальцием депо эндоплазматического ретикулума белки STIM находятся в неактивной конформации, которая стабилизируется взаимодействием доменов CC1 (Coiled-Coil 1) и SOAR (STIM-Orai Activating Region). При опустошении депо белки STIM мультимеризуются, меняют свою конформацию и открывают домен SOAR для взаимодействия с каналами плазматической мембраны [29]. Известно, что соединение 2-APB в концентрациях порядка 10 мкМ вызывает депо-независимый вход кальция, переводя структуру белка STIM2 в активную конформацию [30]. Соединение 2-APB в большей концентрации (50 мкМ), напротив, стабилизирует белок STIM1 в неактивной конформации за счет усиления взаимодействия между доменами CC1 и SOAR и, тем самым, затрудняет взаимодействие домена SOAR с каналами Orai1 и их активацию. Любопытно, что повышение экспрессии Orai1 этот эффект частично нивелирует [31].

Таким образом, соединение 2-APB непосредственно взаимодействует с белками STIM, а значит, является хорошей основой для поиска более селективного модулятора депо-управляемого входа кальция. В данной работе с целью выявления селективного модулятора белка STIM2 протестирована библиотека из 250 химических соединений, полученных от компании InterBioScreen Ltd. и обладающих схожей с 2-APB химической структурой. Обнаружено, что вещество 4-MPTC подавляет STIM2-зависимый вход кальция ($IC_{50} = 1$ мкМ), но практически не влияет на STIM1-зависимый механизм активации депо-управляемых каналов. Остальные 249 соединений из данной библиотеки оказывали разнонаправленный и неселективный эффект.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

В работе использовали модельные клеточные линии, любезно предоставленные Jonathan Soboloff и Mohamed Trebak, созданные на базе клеток линии HEK293: STIM1Orai3 (линия, экспрессирующая экзогенные белки STIM1-YFP и Orai3-CFP), STIM2Orai3 (линия, экспрессирующая экзогенные белки STIM2-YFP и Orai3-CFP) [32], STIM1 KO (линия с подавлением экспрессии белка STIM1 методом CRISPR/Cas9), STIM2 KO (линия с подавлением экспрессии белка STIM2 методом CRISPR/Cas9) и Orai3 KO (линия с подавлением экспрессии белка Orai3 методом CRISPR/Cas9) [30]. Клеточные линии культивировали в среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (0.1 мг/мл) при 37°C и 5% CO₂.

Флуоресцентные измерения

Изменения концентрации внутриклеточного кальция регистрировали с использованием флуоресцентного зонда Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные линии рассевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток за 48 ч до начала измерений. Клетки сначала инкубировали в течение 1 ч в растворе HBSS (мМ: 2 CaCl₂, 130 NaCl, 25 KCl, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES и 10 глюкоза), содержащем 5 мкМ Fluo-4 AM, затем в течение 30 мин в растворе HBSS, содержащем соединение 4-MPTC (InterBioScreen Ltd., Россия) либо 1% DMSO (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в присутствии 2 мМ кальция во внеклеточном растворе на планшетном ридере Fluostar Omega (BMG labtech, Германия). Данные представлены как значения интенсивности флуоресценции Fluo-4, нормированные на базальное значение флуоресценции.

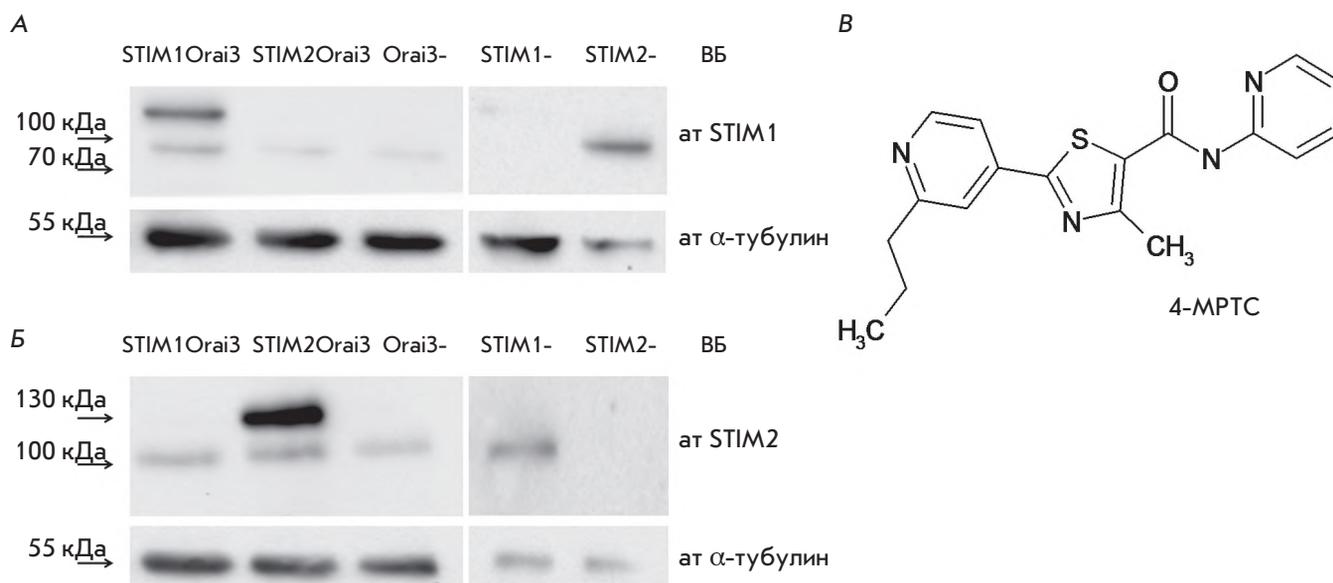


Рис. 1. Уровень экспрессии белков STIM в клеточных линиях STIM1Orai3, STIM2Orai3, Orai3 KO, STIM1 KO и STIM2 KO. А – иммуноблоттинг с использованием антител против STIM1. Б – иммуноблоттинг с использованием антител против STIM2. Для оценки равномерности нанесения проб представлены данные по окрашиванию проб антителами к α -тубулину. В – структурная формула химического соединения 4-MPTC

Электрофорез и иммуноблоттинг

Клетки выращивали на чашках Петри диаметром 60 мм, затем лизировали с добавлением коктейля ингибиторов протеаз. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в 8% полиакриламидном геле. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли полусухим методом на установке для переноса (Hoefer Pharmacia Biotech., Германия). Первичные антитела к STIM1 (Cell Signaling #4917, США), STIM2 (Cell Signaling #5668) и α -тубулину (Sigma-Aldrich #T6074, США) разводили в соотношении 1:1000. Вторичные антитела Anti-Mouse IgG (Sigma-Aldrich #A0168) для α -тубулина и Anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich #A0545) для STIM1 и STIM2. Блоты проявляли на устройстве BioRad Cell Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Низкомолекулярные химические соединения для скрининга, в том числе и 4-MPTC, любезно предоставлены компанией InterBioScreen Ltd. (ibscreen.com) в сухом виде, растворяли в DMSO до концентрации 10 мМ.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Origin 8. Результаты флуоресцентных измерений проверяли на нормальность с помощью критерия Фишера. Группы данных сравнивали с помощью теста Бонферрони, статистически значимые различия отмечены на рисунках: «*» – при доверительном интервале $p < 0.05$,

«***» – при $p < 0.001$ и «n.s.» – различия статистически не значимы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска низкомолекулярных соединений, модулирующих активность белков STIM2, использовали созданную на основе клеток линии HEK293 модельную клеточную линию, стабильно экспрессирующую экзогенные белки STIM2 и Orai3 (клеточная линия STIM2Orai3) (рис. 1А). Эффект влияния тестовых соединений на амплитуду кальциевого сигнала клеток в ответ на опустошение внутриклеточных кальциевых депо регистрировали с помощью флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ. Опустошение внутриклеточных кальциевых депо достигалось путем добавления во внеклеточный раствор 1 мкМ тапсигаргина (Tg), селективного блокатора кальциевых помп эндоплазматического ретикулума. На первом этапе тестировали действие библиотеки аналогов соединения 2-APB на Tg-индуцированный кальциевый ответ. С этой целью клетки инкубировали в растворе HBSS, содержащем каждое из 250 исследуемых соединений (в концентрации 100 мкМ) в течение 30 мин перед началом экспериментов, в которых оценивали амплитуду кальциевого ответа на приложение 1 мкМ Tg. В результате скрининга библиотеки отобрали химическое соединение 4-MPTC (рис. 1В), наиболее сильно влияющее на Tg-индуцированный кальциевый ответ в клетках STIM2Orai3. Кальциевый ответ клеток был подавлен на $39 \pm 3\%$ по сравнению с клетками,

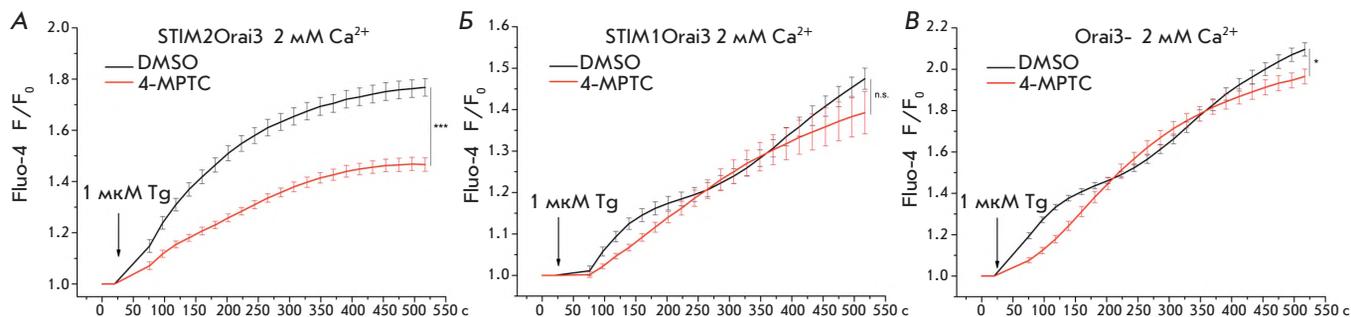


Рис. 2. Влияние соединения 4-MPTC на Tg-индуцированный кальциевый ответ в клеточных линиях с экспрессией экзогенных белков STIM2 и Orai3 (A), STIM1 и Orai3 (Б) и с подавлением экспрессии белка Orai3 (B). Показана зависимость флуоресценции Fluor-4 от времени, нормированная на базальный уровень флуоресценции. До начала эксперимента клетки инкубировали в течение 30 мин в растворе HBSS с добавлением 100 мкМ 4-MPTC. Контрольные клетки инкубировали в течение 30 мин в растворе HBSS с добавлением 1% DMSO. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 12$)

инкубированными в растворе, содержащем 1% DMSO (рис. 2A). Поскольку соединение 4-MPTC существенно подавляет Tg-индуцированный кальциевый ответ в клетках с повышенной экспрессией белков STIM2 и Orai3, то можно полагать, что 4-MPTC модулирует активность именно этих белков. В пользу непосредственного действия 4-MPTC на Orai3 может говорить и тот факт, что соединение 2-APB способно активировать канал Orai3 [27]. Для проверки влияния соединения 4-MPTC на каналы Orai3 использовали клеточную линию HEK293 с нокаутом белка Orai3 (клеточная линия Orai3 KO). Инкубация клеток Orai3 KO с 4-MPTC изменяла форму Tg-индуцированного кальциевого ответа и снижала его амплитуду на $12 \pm 3\%$ (рис. 2B). Более того, в клеточной линии HEK293 с экспрессией экзогенных белков STIM1 и Orai3 (клеточная линия STIM1Orai3) инкубация клеток с соединением 4-MPTC не подавляет амплитуду Tg-индуцированного кальциевого ответа (рис. 2B), а значит, и не уменьшает активность каналов Orai3. Следовательно, белок Orai3 не является селективной мишенью соединения 4-MPTC.

Известно, что активность депо-управляемых каналов в клетке может модулироваться как белками STIM1, так и белками STIM2 [8]. Изменяя уровень экспрессии данных белков, можно управлять преобладающим путем активации депо-управляемого входа либо через белок STIM1, либо через STIM2. Для проверки действия соединения 4-MPTC на белок STIM1 использовали клеточную линию HEK293 с экспрессией экзогенных белков STIM1 и Orai3. Как было сказано выше, инкубация клеток STIM1Orai3 с соединением 4-MPTC меняет форму, но не подавляет амплитуду Tg-индуцированного кальциевого ответа (рис. 2B). Поскольку в клеточной линии STIM2Orai3 соединение 4-MPTC существенно уменьшало амплитуду кальциевого ответа,

но не изменяло форму кривой (рис. 2A), можно предположить, что на путь активации депо-управляемого входа это соединение действует через белок STIM2, но не через STIM1. Изменение формы кривой в клеточных линиях Orai3 KO и STIM1Orai3 достаточно характерно и отражает уменьшение скорости развития кальциевого ответа. Поскольку в клетках Orai3 KO и STIM1Orai3 присутствует эндогенный белок STIM2 (рис. 1B), соединение 4-MPTC может уменьшить активность этого белка и тем самым изменить динамику как выброса кальция из депо в цитоплазму, так и входа внеклеточного кальция. Аналогичное влияние на кальциевый ответ оказывает нокаут белка STIM2 с применением коротких интерферирующих РНК, который уменьшает и выброс кальция из депо [33], и последующий вход [4, 34]. Клеточные линии со сверхэкспрессией белков STIM (STIM1Orai3, STIM2Orai3) содержат эндогенные белки STIM1 и STIM2 (рис. 1A,Б), что затрудняет интерпретацию результатов. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали клеточные линии с нокаутом белков STIM1 (клеточная линия STIM1 KO) и STIM2 (клеточная линия STIM2 KO), которые лишены этого недостатка (рис. 1A,Б).

При полном подавлении экспрессии STIM1 белок STIM2 становится ключевым и единственным активатором депо-управляемого входа кальция [4]. Предварительное инкубирование клеток STIM1 KO с 4-MPTC уменьшало на $57 \pm 8\%$ Tg-индуцированный кальциевый ответ по сравнению с контролем (инкубация с 1% DMSO) (рис. 3A). Необходимо отметить, что в этих условиях 4-MPTC более эффективно подавляет депо-управляемый вход кальция. Так, в клеточной линии STIM1 KO Tg-индуцированный ответ был подавлен на 57%, тогда как в клетках STIM2Orai3 подавление составило 39%. В клетках с нокаутом белка STIM2, в которых единственным

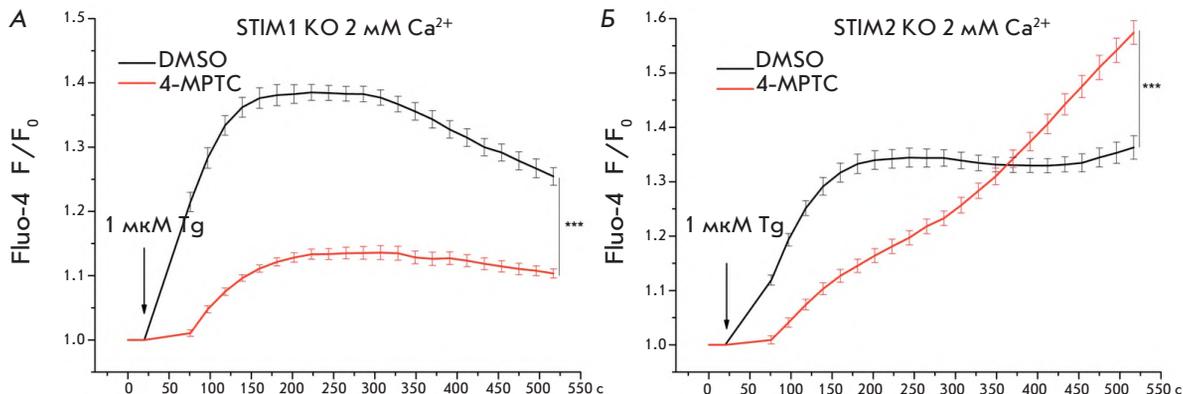


Рис. 3. Влияние соединения 4-MPTC на Tg-индуцированный кальциевый ответ в клеточных линиях с подавлением экспрессии белка STIM1 (А) и STIM2 (Б). Показана зависимость флуоресценции Fluo-4 от времени, нормированная на базальный уровень флуоресценции. До начала эксперимента клетки инкубировали в течение 30 мин в растворе HBSS с добавлением 100 мкМ 4-MPTC. Контрольные клетки инкубировали в течение 30 мин в растворе HBSS с добавлением 1% DMSO. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 12$)

активатором депо-управляемого входа кальция является белок STIM1, наблюдается существенное изменение формы кривой Tg-индуцированного ответа после инкубации с соединением 4-MPTC, концентрация кальция увеличивается медленнее, чем в контрольных клетках, но максимальная амплитуда кальциевого ответа выше на $61 \pm 5\%$ (рис. 3Б). Экспериментально показано, что соединение 4-MPTC в клеточных линиях STIM1 KO и STIM2 KO действует разнонаправленно, ингибируя кальциевый ответ через STIM2-зависимые пути и увеличивая его через STIM1-зависимые пути. Таким образом, отобранное нами соединение 4-MPTC обеспечивает возможность разделения путей активации депо-управляемого входа через различные белки STIM, но механизм действия этого соединения требует уточнения.

Соединение 4-MPTC имеет характерную кривую зависимости эффекта действия от концентрации (рис. 4). Изучено действие 4-MPTC в концентрации 0.001, 0.1, 1, 10 и 100 мкМ на Tg-индуцированный кальциевый ответ в клетках STIM2Orai3. Величина концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) составляет 1 мкМ и рассчитана по аппроксимирующей кривой.

Таким образом, из представленных выше результатов можно заключить, что в клеточных линиях с преобладающим количеством белка STIM2 (STIM1 KO, STIM2Orai3) применение 4-MPTC существенно подавляет амплитуду кальциевого ответа на Tg. А в клеточных линиях с преобладающим количеством белка STIM1 (STIM2 KO, STIM1Orai3) соединение 4-MPTC изменяет форму кривой кальциевого ответа без уменьшения его амплитуды. Т.е. соединение 4-MPTC селективно подавляет вход

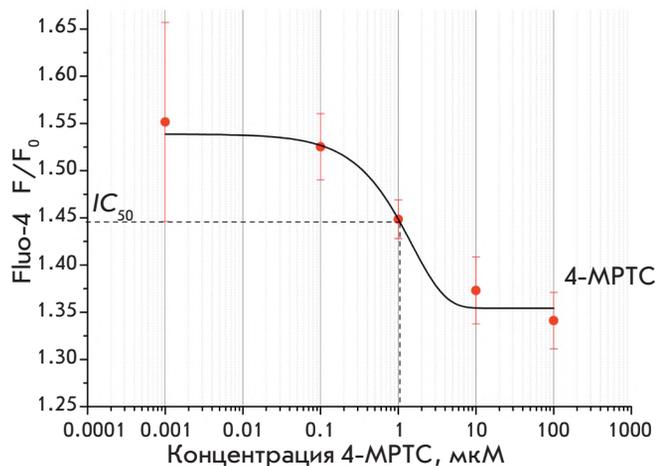


Рис. 4. Зависимость амплитуды Tg-индуцированного кальциевого ответа от концентрации соединения 4-MPTC в клеточной линии, экспрессирующей экзогенные белки STIM2 и Orai3. Показано значение флуоресценции Fluo-4 на 9-й мин эксперимента, нормированное на базальный уровень флуоресценции. До начала эксперимента клетки инкубировали в течение 30 мин с различными концентрациями 4-MPTC (0.001, 0.1, 1, 10 и 100 мкМ). Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 6$). Пунктиром обозначены уровень подавления на 50% от максимального и концентрация полумаксимального ингибирования ($IC_{50} = 1$ мкМ)

кальция при депо-управляемом входе через STIM2-зависимый, но не через STIM1-зависимый путь.

Несмотря на то что соединение 2-APB широко применяется как блокатор депо-управляемого входа кальция, оно недостаточно селективно подавляет

депо-зависимый вход, а кроме того, имеет разнонаправленный эффект в зависимости от концентрации. В поисках блокатора, лишённого перечисленных недостатков, исследуют производные 2-АРВ [35–41]. Большинство найденных соединений подавляют депо-управляемый вход в меньших концентрациях, чем 2-АРВ, а также лишены способности активировать вход кальция при определенных концентрациях, иными словами, обладают лучшими блокирующими свойствами, чем исходное соединение. При поиске новых блокаторов депо-управляемого входа большее внимание уделяется STIM1-зависимому пути активации депо-управляемого входа, а STIM2-зависимый путь часто остается неисследованным. Например, в качестве модельных используют клетки линии MDA-MB-231, где ключевую роль в депо-зависимом входе играют белки STIM1 и Orail, либо клетки HEK293, экспрессирующие STIM1 и белки семейства Orail [42, 43]. Исследование соединений DPB163-AE и DPB162-AE показало, что они по-разному взаимо-

действуют со STIM1 и STIM2, но в результате подавляют депо-зависимый вход через оба эти белка [37]. Обнаруженное нами соединение 4-MPTC обладает ингибирующим эффектом на STIM2-зависимый путь, но не подавляет вход кальция через STIM1-зависимый путь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скрининг библиотеки аналогов соединения 2-АРВ клеток позволил отобрать соединение 4-MPTC, которое оказывает ингибирующий эффект на Tg-индуцированный кальциевый ответ клеток через STIM2-зависимый путь поступления кальция, но не подавляет вход кальция через STIM1-зависимый путь. Механизм действия этого соединения на белок STIM2 требует дальнейшего уточнения.●

*Работа поддержана грантами
РФФИ № 17-54-80006 (АС, АГ, ЛГ, ЕК)
и РНФ № 19-14-00114 (АС, АШ, ЕК).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Putney J.W. // Cell Calcium 1986. V. 7. № 1. P. 1–12.
- Yao Y., Tsien R.Y. // J. Gen. Physiol. 1997. V. 109. № 6. P. 703–715.
- Zhang S.L., Yu Y., Roos J., Kozak J.A., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Stauderman K.A., Cahalan M.D. // Nature. 2005. V. 437. № 7060. P. 902–905.
- Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E., Meyer T. // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 13. P. 1235–1241.
- Stathopoulos P.B., Zheng L., Li G., Plevin M.J., Ikura M. // Cell. 2008. V. 135. № 1. P. 110–122.
- Brandman O., Liou J., Park W.S., Meyer T. // Cell. 2007. V. 131. № 7. P. 1327–1339.
- Ong H.L., De Souza L.B., Zheng C., Cheng K.T., Liu X., Goldsmith C.M., Feske S., Ambudkar I.S. // Sci. Signaling. 2015. V. 8. № 359. P. 3.
- Shalygin A., Skopin A., Kalinina V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 8. P. 4717–4727.
- Prakriya M. // Curr. Topics Membranes. 2013. V. 71. P. 1–32.
- Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A., Hogan P.G. // Nature. 2006. V. 443. № 7108. P. 230–233.
- Skopin A., Shalygin A., Vigont V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E. // Biochimie. 2013. V. 95. № 2. P. 347–353.
- Kaznacheyeva E., Glushankova L., Bugaj V., Zimina O., Skopin A., Alexeenko V., Tsiokas L., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662.
- Cheng K.T., Ong H.L., Liu X., Ambudkar I.S. // Adv. Exp. Med. Biol. 2011. V. 704. P. 435–449.
- Vigont V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheyeva E. // Front. Physiol. 2015. V. 6. P. 337.
- Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., et al. // Mol. Neurodegen. 2016. V. 11. P. 27.
- Ryazantseva M., Skobeleva K., Glushankova L., Kaznacheyeva E. // J. Neurochem. 2016. V. 136. № 5. P. 1085–1095.
- Ryazantseva M., Skobeleva K., Kaznacheyeva E. // Biochimie. 2013. V. 95. № 7. P. 1506–1509.
- Berna-Erro A., Braun A., Kraft R., Kleinschnitz C., Schuhmann M.K., Stegner D., Wulstsch T., Eilers J., Meuth S.G., Stoll G., Nieswandt B. // Sci. Signaling. 2009. V. 2. № 93. P. ra67.
- Rao W., Zhang L., Peng C., Hui H., Wang K., Su N., Wang L., Dai S.H., Yang Y.F., Chen T., Luo P., Fei Z. // Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis. 2015. V. 1852. № 11. P. 2402–2413.
- Hou P.F., Liu Z.H., Li N., Cheng W.J., Guo S.W. // Cell. Mol. Neurobiol. 2015. V. 35. № 2. P. 283–292.
- Miao Y., Shen Q., Zhang S., Huang H., Meng X., Zheng X., Yao Z., He Z., Lu S., Cai C., Zou F. // Breast Cancer Res. 2019. V. 21. № 1. P. 99.
- Sobradillo D., Hernández-Morales M., Ubierna D., Moyer M.P., Núñez L., Villalobos C. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 42. P. 28765–28782.
- Maruyama T., Kanaji T., Nakade S., Kanno T., Mikoshiba K. // J. Biochem. 1997. V. 122. № 3. P. 498–505.
- Prakriya M., Lewis R.S. // J. Physiol. 2001. V. 536. № 1. P. 3–19.
- Hu H.Z., Gu Q., Wang C., Colton C.K., Tang J., Kinoshita-Kawada M., Lee L.Y., Wood J.D., Zhu M.X. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 34. P. 35741–35748.
- Singh A.K., Saotome K., McGoldrick L.L., Sobolevsky A.I. // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1. P. 2465.
- Schindl R., Bergsmann J., Frischauf I., Derler I., Fahrner M., Muik M., Fritsch R., Groschner K., Romanin C. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 29. P. 20261–20267.
- Missiaen L., Callewaert G., De Smedt, H. Parys J.B. // Cell Calcium. 2001. V. 29. № 2. P. 111–116.
- Soboloff J., Rothberg B.S., Madesh M., Gill D.L. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. V. 13. № 9. P. 549–565.
- Emrich S.M., Yoast R.E., Xin P., Zhang X., Pathak T., Nwokoko R., Gueguinou M.F., Subedi K.P., Zhou Y., Ambudkar I.S., et al. // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 16. P. 6318–6332.
- Wei M., Zhou Y., Sun A., Ma G., He L., Zhou L., Zhang S., Liu J., Zhang S.L., Gill D.L. Wang Y. // Pflugers Arch. Eur. J.

- Physiol. 2016. V. 468. № 11–12. P. 2061–2074.
32. Parvez S., Beck A., Peinelt C., Soboloff J., Lis A., Monteilh-Zoller M., Gill D.L., Fleig A., Penner R. // *FASEB J.* 2008. V. 22. № 3. P. 752–761.
33. Thiel M., Lis A., Penner R. // *J. Physiol.* 2013. V. 591. № 6. P. 1433–1445.
34. Bird S., Hwang S.Y., Smyth J.T., Fukushima M., Boyles R.R., Putney J.W. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 20. P. 1724–1729.
35. Djillani A., Doignon I., Luyten T., Lamkhieued B., Gangloff S.C., Parys J.B., Nüße O., Chomienne C., Dellis O. // *Cell Calcium.* 2015. V. 58. № 2. P. 171–185.
36. Djillani A., Nüße O., Dellis O. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2014. V. 1843. № 10. P. 2341–2347.
37. Goto J.I., Suzuki A.Z., Ozaki S., Matsumoto N., Nakamura T., Ebisui E., Fleig A., Penner R., Mikoshiba K. // *Cell Calcium.* 2010. V. 47. № 1. P. 1–10.
38. Hendron E., Wang X., Zhou Y., Cai X., Goto J.I., Mikoshiba K., Baba Y., Kurosaki T., Wang Y., Gill D.L. // *Cell Calcium.* 2014. V. 56. № 6. P. 482–492.
39. Zhou H., Iwasaki H., Nakamura T., Nakamura K., Maruyama T., Hamano S., Ozaki S., Mizutani A., Mikoshiba K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 352. № 2. P. 277–282.
40. Hofer A., Kovacs G., Zappatini A., Leuenberger M., Hediger M.A., Lochner M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. № 11. P. 3202–3213.
41. Dellis O., Mercier P., Chomienne C. // *BMC Pharmacol.* 2011. V. 11. P. 1.
42. Schild A., Bhardwaj R., Wenger N., Tscherrig D., Kandassamy P., Dornič J., Baur R., Peinelt C., Hediger M.A., Lochner M. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 16. P. 1–28.
43. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Hendron E., Mancarella S., Andrade M.D., Rothberg B.S., Soboloff J., Gill D.L. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3183.

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:

- 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).

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 μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » 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 (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, 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 цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). 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.