

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 575.16

Рег. № ГЗ 0088-2021-0007

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490130-1

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
А.В. Васильев
«28» декабря 2021 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА

(промежуточный)

Руководитель НИР,
заведующий лабораторией
доктор биологических наук

О.Б. Симонова

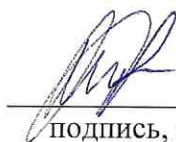
28.12.2021

подпись, дата

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий
лабораторией, доктор биологических
наук



О.Б. Симонова (раздел 1)

подпись, дата 28.12.2021

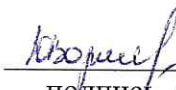
Исполнители:
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



И.Б.. Мерцалов (раздел 2)

подпись, дата 28.12.2021

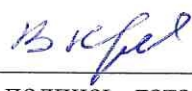
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



Ю.Е. Воронцова (раздел 3)

подпись, дата 28.12.2021

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук



В.А. Краевский (раздел 4)

подпись, дата 28.12.2021

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук



Е.С. Васецкий (раздел 5,6)

подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук



Я.Р. Мусинова (раздел 6)

подпись, дата

Нормоконтроль, руководитель
информационно-аналитического отдела,
кандидат биологических наук



Е.Б. Абрамова

подпись, дата 28.12.2021

РЕФЕРАТ

Отчет 58 с., 6 разделов, 20 рис., 0 табл., 53 источника, 11 отчетных публикаций по теме.

МОРФОГЕНЕЗ, НЕЙРОГЕНЫ, ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ, ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ, НУКЛЕОСОМЫ, ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ, КСЕНОБИОТИКИ, ГЛИОМЫ, МЫШЕЧНЫЕ ДИСТРОФИИ, ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНА

Объектом исследования являются биологические системы, созданные на основе модельных организмов, культивируемых клеток человека и дрожжевых экстрактов, позволяющие решать теоретические и практически значимые задачи в экспериментах *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*.

Основная цель работы состояла в исследовании механизмов дифференциальной активности генов в ходе нормального развития и при патологии, а также в разработке новых моделей генетически наследуемых синдромов человека.

В работе использованы как традиционные методы генетического и биоинформационного анализа, так и новейшие методы геной, клеточной инженерии и физико-химического анализа.

Исследованы механизмы формирования генов *de novo* на примере эволюционной истории и динамики экспрессии видоспецифического гена *lawc*. Установлен эволюционный и функциональный консерватизм домена 2/3 нейроспецифических белков семейства D4 в экспериментах на *D. melanogaster*. Обнаружена связь между сигнальным путём активации генов-мишеней АНР и системой эпигенетической регуляции экспрессии генов в культивируемых опухолевых клетках глиобластомы человека. Верифицирована новая фундаментальная концепция эпигенетического кода с помощью исследования динамики реконструированных *in vitro* H2Vub-нуклеосом. Создана модельная система для изучения наследуемых патологий, вызванных хромосомными транслокациями (лимфома Беркитта и рак легких). Охарактеризованы новые морфологические и биохимические признаки осложнений при мышечной дистрофии ЛПЛМД.

Результаты исследований могут использоваться при ранней диагностике рака; для оптимизации терапевтических схем применения фармацевтических средств с учётом возможных побочных эффектов их действия; позволят разработать персонифицированные стратегии и фармакологические подходы на генетическом и клеточном уровне с целью восстановления функций генов в условиях *in vivo*. Их разработка поможет внести дополнительные параметры, необходимые для персонифицированной паспортизации учёта потенциальных рисков заболеваний граждан РФ.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Раздел 1. Роль активной транскрипции и некодирующих РНК, как потенциальных источников генообразовательных процессов.....	8
Раздел 2. Роль транскрипционных факторов семейства D4 в регуляции нейрогенеза	16
Раздел 3. Интерференция генетических механизмов регуляции морфогенеза и биодegradации ксенобиотиков	23
Раздел 4. Регуляция активности генов и процессы онтогенеза	29
Раздел 5. Изучение взаимодействия мезенхимальных стволовых клеток и миобластов в патогенезе мышечных заболеваний	37
Раздел 6. Влияние ядерной архитектуры на возникновение хромосомных перестроек в разных типах клеток	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	55
ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ	57

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

а.к.о. - аминокислотные остатки

ИМ - иммортализованные миобласты

К34 – лизин гистона в положении 34

К120 - лизин гистона в положении 120

кДа – килодальтон

ЛПЛМД - лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия (или FSHD)

МД – мышечная дистрофия

МСК - мезенхимальные стволовые клетки

нкРНК – некодирующая РНК

НС – нервная система

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОРС – открытая рамка считывания

ПМ - первичные миобласты

п.н. – пара нуклеотидов

п.о. – пара оснований

ПТМ - посттрансляционные модификации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

AHR - Aryl Hydrocarbon Receptor

ARNT - AHR Nuclear Translocator

ВАС - бактериальные искусственные хромосомы

CXCL12-CXCR4 - хемокиновая сигнальная ось

DAPI – 4',6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride

FRET (Fluorescence Energy Transfer) - флуоресцентный резонансный перенос энергии

GFP - зеленый флуоресцирующий белок

lawc – ген *leg-arista-wing complex*

NAP - Nucleosome Assembly Protein

TRF2 –TBP-related Factor 2 (фактор базовой транскрипции 2 семейства TBP)

TTH – ген дрозофилы *toothrin*

UAS - Upstream Activating Sequence

Ub - убиквитин

ВВЕДЕНИЕ

Направление исследований темы связано с изучением эволюционно-консервативных молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза в норме и при патологии. В этом аспекте большое значение имеет исследование роли конкретных генов и генных семейств, контролирующих развитие, а также создание и применение модельных систем, имитирующих различные генетические наследственные заболевания и рак.

Одна из задач заключалась в изучении функций белка ТТН, родственного семейству белков D4 – предполагаемых ко-активаторов транскрипции нейрогенов у позвоночных животных. Для выявления паттерна его экспрессии у дрозофилы, геном которой несет единственную копию гена *tth*, использовали полученные антитела к ТТН и созданные гибридные белки (ТТН::GFP).

Другая задача была связана с проблемой «самозарождения» новых генов. Эта проблема обозначилась недавно, после того как в биоинформационных исследованиях оценили высокую вероятность возникновения генов *de novo*, то есть «с нуля», ранее считавшуюся практически невозможной. Возникла необходимость поиска реальных представителей таких генов. Тем не менее, основной проблемой доказательства гипотезы возникновения генов *de novo* является подтверждение функциональности коротких пептидов, кодируемых этими генами. Текущий этап предполагал изучение эволюционной истории и оценку временной экспрессии гена *lawc*, который предполагается возник *de novo* у *D. melanogaster*.

Задача создания моделей для исследования наследуемых синдромов человека предполагала разработку уникальной системы, которая будет имитировать онкозаболевания (лимфома Беркитта, рак легких, рак яичников), вызванные хромосомными aberrациями – транслокациями. Цель работы - изучение механизма хромосомных транслокаций на основе восстановления в результате транслокации транскрипта *Egfr*, разделенного на два «экзона» с помощью искусственного универсального интрона, несущего сайт узнавания для фермента I-Sce. Такой подход позволит выявить фундаментальные механизмы, приводящие к хромосомным перестройкам в клетках человека, и влияние эпигенетических факторов на эти процессы. Началась работа в этом направлении.

На созданной нами ранее модельной системе, имитирующей лице-плече-лопаточную мышечную дистрофию (ЛПЛМД), исследовали влияние миобластов от больных ЛПЛМД на пролиферацию, дифференцировку и секреторную активность МСК.

Мы предположили, что мышечное истощение и фиброз мышц, связанные с раком, лице-плече-лопаточной мышечной дистрофией и мышечной дистрофией Дюшена, могут быть вызваны воспалительной реакцией через аномальную активацию цитокинов CXCL12 и их рецепторов CXCR4.

Сейчас уже ни у кого не вызывает сомнения, что роль наследственности в индивидуальном развитии не ограничивается молекулярно-генетическим аспектом, и изучение эпигенетических (эпигеномных) механизмов приобретает такое же важное значение. Их исследование необходимо для выяснения природы факторов компетенции, детерминации и их реализации в виде конкретных программ дифференцировки, где основную роль играют модификации гистонов, белков упаковки ДНК в ядре. Ранее мы показали, что определенные модификации гистонов (H2Bub) способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК. Задачей текущего этапа стало изучение принципов регулирования структуры и функций хроматина за счет «объемных» модификаций ('bulky' modifications) гистонов, а именно исследование динамики реконструированных *in vitro* H2Bub-нуклеосом методом молекулярной спектроскопии.

При исследовании сигнального пути арил-гидрокарбонового рецептора человека – AHR - в экспериментах *in vivo* на дрозофиле мы обнаружили связь между сигнальным путём активации генов-мишеней этого рецептора и системой эпигенетической регуляции их экспрессии. Ранее было показано, что что сигнальный путь с участием рецептора AHR играет важную роль в процессах пролиферации и дифференцировки в опухолевых тканях. Однако AHR-путь и влияние на него эпигенетических факторов в условиях канцерогенеза до сих пор не исследовали. Тем не менее, ингибиторы гистоновых модификаторов и лиганды AHR часто входят в состав лекарственных препаратов, которые используют при лечении разных типов рака. Наша задача заключалась в изучении эпигенетических факторов в регуляции транскрипции генов-мишеней AHR в культивированных опухолевых клетках глиобластомы.

Таким образом, перед нами стояли задачи на основе применения новых экспериментальных платформ уточнить важные параметры участия различных генетических и эпигенетических факторов в регуляции эмбрио-, органо-, гистогенеза и клеточной дифференцировки. Для ряда объектов исследования была необходима предварительная разработки новых экспериментально-технологических методов анализа процессов развития и воздействия на него.

РАЗДЕЛ 1 РОЛЬ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ГЕНООБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

1.1 Введение

Феномен формирования новых генов является бурно обсуждаемым и изучаемым в современной эволюционной генетике. Основным механизмом возникновения генов принято считать дубликации предкового гена с последующей дивергенцией новых копий. Этот механизм подразумевает использование в качестве исходного материала гены, существующие у предковых организмов. Возможность происхождения полностью функционального гена *de novo* внутри некодирующей ДНК не отвергалась, но до последнего времени практически сводилась к нулю. Тем не менее, недавно было показано, что около 12% среди новых (по сравнению с эволюционными предками) генов дрозофилы могли возникнуть *de novo*. Появляются данные, что похожие процессы могут происходить и в геноме человека [1]. Общими характеристиками этих генов являются: короткая, кодирующая примерно 100 а.к.о., безинтронная рамка считывания; их расположенность внутри интронов других генов; таксон-специфичность (или даже видоспецифичность), отчего их часто называют орфанными (Orphan, осиротелый) генами. Относительно высокая вероятность возникновения генов *de novo*, оцененная в биоинформационных исследованиях, подняла интерес к этой теме в последнее десятилетие и сделала актуальным поиск их реальных представителей [1]. Тем не менее основной проблемой при доказательстве гипотезы возникновения генов *de novo* является экспериментальное подтверждение функциональности коротких пептидов, кодируемых этими генами.

Цель работы - изучение механизма происхождения генов *de novo* и, в частности, роли активной транскрипции и некодирующих РНК как потенциальных источников генообразовательных процессов. В своей работе мы использовали хорошо охарактеризованную нами модельную генетическую систему уникального сложноустроенного локуса *leg-arista-wing complex/TBP related factor 2 (lawc/Trf2)* дрозофилы *D. melanogaster*. Локус представляет собой систему разнонаправленных перекрывающихся, кодирующих белок транскриптов генного комплекса, мутации которого нарушают экспрессию многих нейрогенов и транскрипционных факторов. Один из двух генов этого комплекса - ген *lawc* - является таксон-специфическим и предположительно мог сформироваться *de novo*. ОПС этого гена не содержит интроны и кодирует короткий пептид размером 73 а.к., функция которого неизвестна. Кроме того, *lawc* кодирует пул полоспецифических некодирующих РНК (нкРНК), возможно, с особыми функциями. Регуляторная роль нкРНК в настоящее время хорошо известна [2]. Одной из важных

характеристик функционального гена является его транскрипционный потенциал, поэтому в 2021 году мы поставили задачу исследовать динамику временной экспрессии *lawc* в онтогенезе.

Поскольку важно не только определить функциональность гена, возникшего *de novo*, но и доказать отсутствие его функциональных эволюционных предшественников, нашей второй задачей в 2021 году стал анализ эволюционной истории гена *lawc* у родственных видов дрозофилы.

1.2 Материалы и методы

Для того чтобы исследовать временную экспрессию *lawc*, мы провели поэтапный сбор особей на стадиях эмбрионального и пост-эмбрионального развития и выделили мРНК из собранных образцов. Далее провели Нозерн-блот гибридизацию и проанализировали особенности динамики и уровень временной экспрессии гена *lawc*. Карта гена и зонд для Нозерн-блот гибридизации представлена на рисунке 1.1.

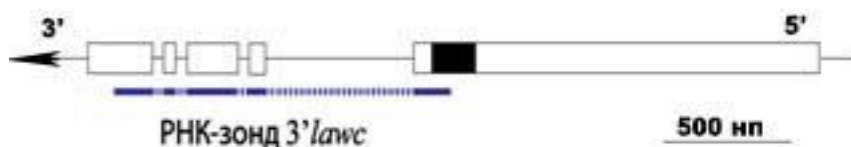


Рисунок 1.1 - Карта гена *lawc*

Направление транскрипции указано стрелкой, широкие прямоугольники – экзоны, чёрным закрашена кодирующая белок область первого экзона, линиями обозначены интроны. Синим цветом обозначен зонд для Нозерн-блот гибридизации.

Поиск гомологов белка Lawc и транскриптов проводили с помощью программного обеспечения BLAST [3], HMMER, использующего скрытые модели Маркова, а также HHBlits [4-5], PSI-Blast [6], tBLASTn [3], позволяющие обнаружить гомологи в филогенетически значительно удаленных геномах.

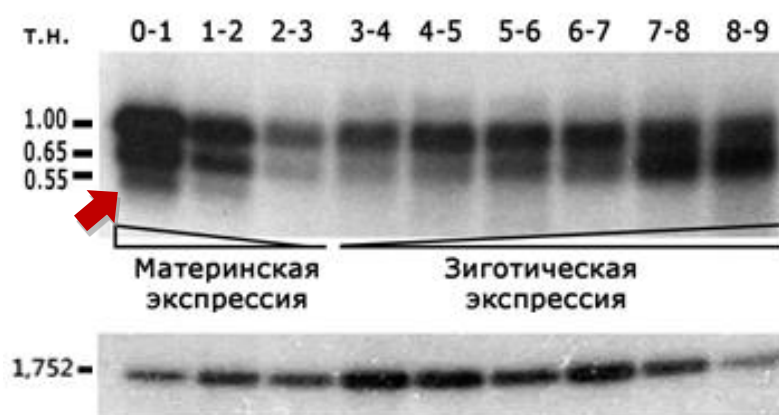
1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Временная экспрессии мРНК гена *lawc* в онтогенезе

Одной из характеристик функционирующего гена является его экспрессия. Основной проблемой при доказательстве гипотезы возникновения генов *de novo* является экспериментальное подтверждение функциональности их коротких белков и некодирующих РНК. Первое, что мы сделали – это провели ряд экспериментов, чтобы охарактеризовать временной профиль и динамику экспрессии гена *lawc* у *D. melanogaster*.

Нозерн-блот анализ показал, что ген *lawc* проявляет материнскую экспрессию и вырабатывает три мРНК, но только две из них (длиной 1000 н. и 650 н.) с разной интенсивностью выявляются на всех стадиях развития дрозофилы (рисунок 1.2). Третий *lawc*-транскрипт (длиной 550 н.) не кодирует белок и является полоспецифическим. Он характерен только самкам, и выявляется у ранних эмбрионов доклеточных стадий развития (красные стрелки на рисунке 1.2). На стадии 7-8 часов эмбрионального развития происходит переключение доминирующего транскрипта с тяжелого, размером 1000 н. на легкий, размером 650 н., которое сохраняется на всех последующих стадиях развития дрозофилы, включая взрослых самцов, но не самок.

А



Б

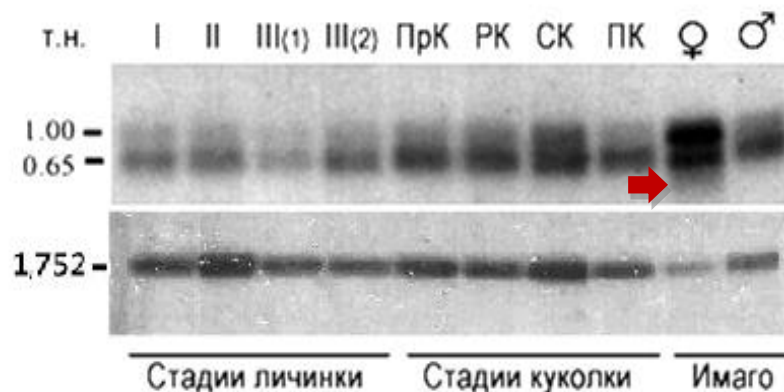


Рисунок 1.2 - Нозерн-блот гибридизация поли(А)+РНК, выделенной из почасовых эмбрионов (А) и особей постэмбриональных стадий (Б), с РНК-зондом из района гена *lawc*. Вверху числа обозначают возраст эмбрионов в часах и стадии постэмбрионального развития: I – первая личиночная стадия, II – вторая личиночная стадия, III₍₁₎ – третья личиночная стадия 1, III₍₂₎ – третья личиночная стадия 2, ПрК – предкуколка, РК – ранняя куколка, СК – средняя куколка, ПК – поздняя куколка, ♀ - самки, ♂ - самцы. Ниже, под каждым радиоавтографом представлена нормализующая гибридизация того же самого фильтра с пробой к гену альфа-тубулина (*alphaTub84B*). Красная стрелка указывает на полоспецифический минорный транскрипт.

Таким образом мы впервые описали динамику временной экспрессии гена *lawc* в онтогенезе и показали наличие *lawc*-транскриптов материнского происхождения. Экспрессия этого гена является полоспецифической: отличается у самок и самцов. Концентрация *lawc*-транскриптов меняется в зависимости от стадии развития и, возможно, инициируется с разных промоторов. Такие особенности экспрессии, как динамичность полоспецифичность и материнское происхождение, могут свидетельствовать в пользу функциональности гена *lawc* и его продуктов.

1.3.2 Поиск эволюционных предшественников гена *lawc*

В целях изучения эволюционной истории гена *lawc* мы провели биоинформатическое исследование синтенных районов у различных видов рода *Drosophila* (мат. методы). Оказалось, что полноценная рамка считывания *lawc* есть только в геномах видов группы *melanogaster* (рисунок 1.3).

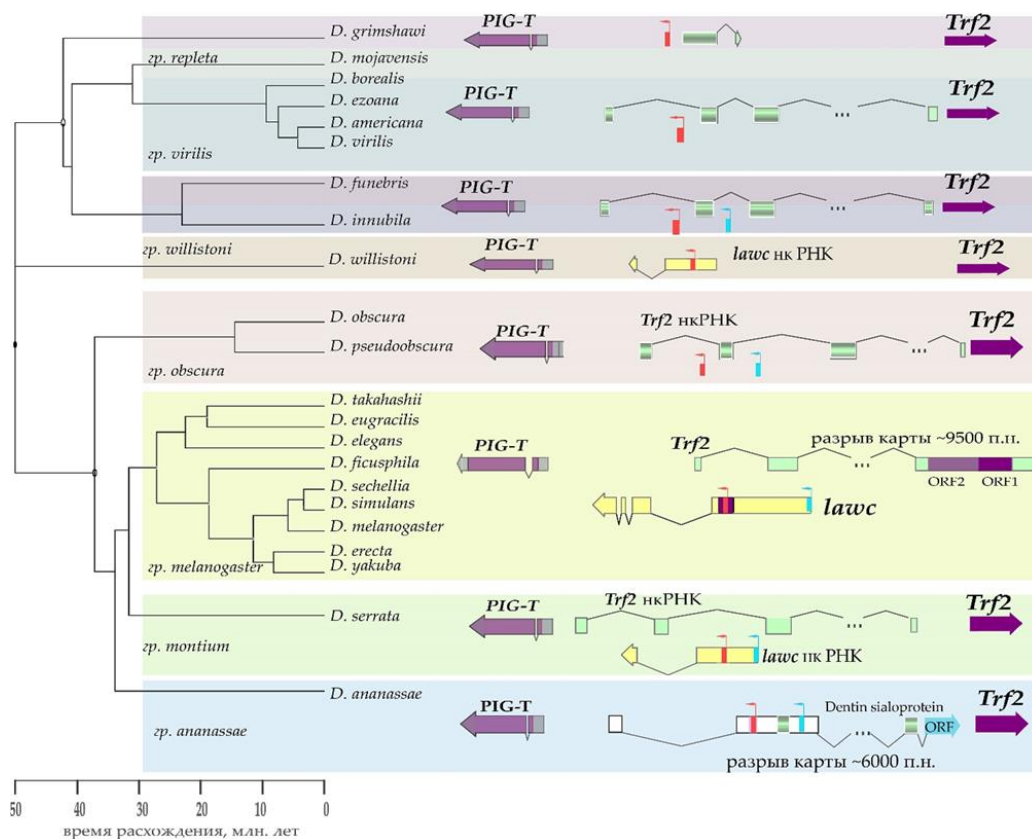


Рисунок 1.3 – Эволюционная история гена *lawc*

Показано эволюционное древо *Drosophila*. Разным цветным фоном выделены разные группы рода *Drosophila*. Жёлтым, зеленым и серым обозначены экзоны генов *lawc*, *Trf2* и *PIG-T*, соответственно. Фиолетовым цветом выделены рамки считывания *lawc* и эволюционно-консервативных генов *PIG-T* и *Trf2*. Красным и голубым цветом выделены последовательности консервативных промоторов *lawc*. Стрелки указывают направление транскрипции.

Тем не менее, районы, кодирующие предполагаемые транскрипты *lawc* есть в геномах даже у таких отдалённых от *D. melanogaster* видов, как *D. willistoni* и *D. serrata*. Однако эти транскрипты не несут информацию о белке, т.е. являются некодирующими и относятся к классу нкРНК.

Ранее мы идентифицировали предполагаемый промотор с коровой последовательностью без TATA-бокса (TATA-less) в районе OPC гена *lawc* (рисунок 1.4 А). Чтобы доказать функциональность этого промотора, мы показали его способность активировать транскрипцию гена-репортера в культуре клеток дрозофилы S2 и даже в культуре клеток человека HEK293. Используя 5'RLM-RACE, мы показали, что этот промотор инициирует синтез пула нкРНК *lawc*.

А



Б

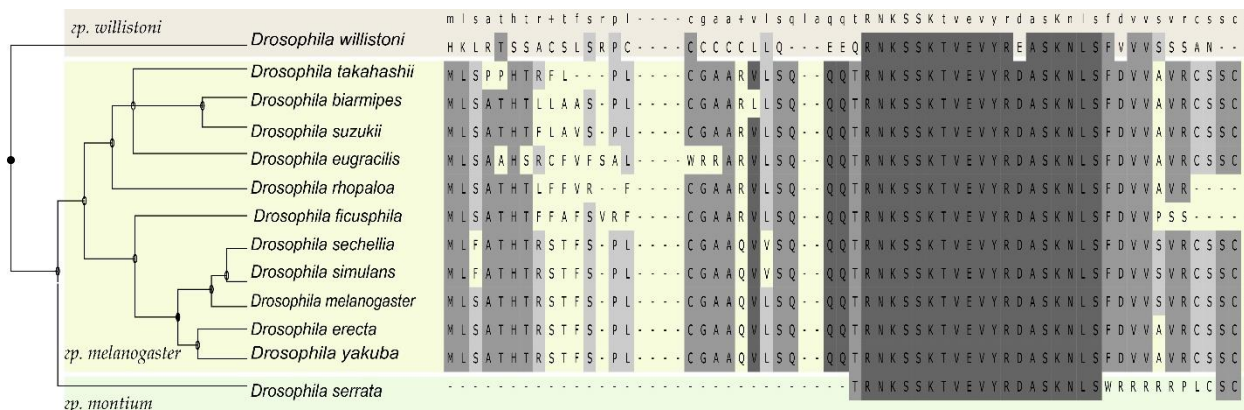


Рисунок 1.4 – Открытая рамка *lawc* содержит консервативный промотор

А – регионы OPC *lawc* у *D. melanogaster*. Б – эволюционно-консервативный среди *Drosophila* фрагмент белка Lawc (серый цвет), соответствующий промотерной области, выделенной синим цветом цветом на А.

Мы показали, что последовательность этого промотора содержит консервативный участок и встречается в соответствующем регионе генома у всех проанализированных видов *Drosophila* (рисунок 1.4 Б). Тем не менее у большинства эволюционно удаленных от

D. melanogaster видов с этим промотором не ассоциированы какие-либо транскрипты (рисунок 1.3). Исключение составляют вышеупомянутые виды из группы *melanogaster* с предполагаемыми *lawc*-транскриптами, а также *D. willistoni*, *D. serrata* и, возможно, *D. ananassae*. Эти данные указывают на то, что формирование гена *lawc* происходило вокруг этого промотора в следующем порядке: промотор → ген, кодирующий нкРНК → ген, кодирующий белок.

Возникшие *de novo* гены часто кодируют белки с высокой внутренней неупорядоченностью, то есть они не способны образовывать выраженную трехмерную структуру [1]. Бионформатический анализ аминокислотной последовательности белка Lawc (73 а.к.о.) с помощью программного обеспечения PredictProtein [7] показал наличие протяженного (37 а.к.о.) района внутренней неупорядоченности (рисунок 1.4 А). Анализ базы данных Pfam [8] не выявил функциональных доменов у белка, кодируемого геном *lawc*, что также является характерным для генов, возникших *de novo*.

Несмотря на имеющиеся данные об экспрессии *lawc* на уровне мРНК, данных об экспрессии его белка мало. Проведенный нами анализ результатов рибосомного профайлинга (профилирование рибосом - глубокое секвенирование защищенных рибосомами фрагментов мРНК) с помощью геномного браузера GWIPS-viz [9] показал, что мРНК *lawc* действительно связывается с рибосомами по крайней мере в клетках S2 и двухчасовых эмбрионах (рисунок 1.5).

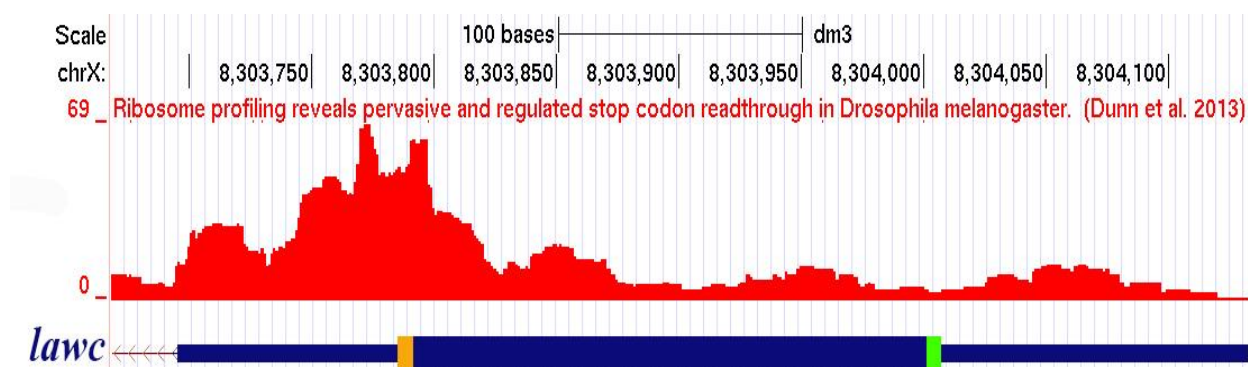


Рисунок 1.5 – Визуализация данных рибосомного профайлинга района локуса *lawc* у *D. melanogaster* в программе GWIPS-viz [9]

Вверху показан масштаб и положение гена *lawc* на карте X хромосомы. Красные пики – количество прочтений мРНК (РНК-Seq) на А-сайтах элонгирующих рибосом, полученные по результатам рибо-секвенирования [10]. Внизу: синим цветом отмечен район ОРС гена *lawc*, зеленым - старт-кодон, оранжевым стоп-кодон. Стрелками показано направление транскрипции.

Это значит, что белок Lawc способен экспрессироваться, но на очень низком уровне, что характерно для генов, возникших *de novo*.

1.4 Заключение

Мы впервые исследовали временной профиль экспрессии в онтогенезе и реконструировали эволюционную историю гена *lawc*. Наши предварительные данные выявили активность этого гена на всех стадиях развития дрозофилы. Анализ эволюционной истории *lawc* показал, что этот ген возник примерно 30 млн лет назад. Мы склоняемся в пользу гипотезы «transcription first», когда генообразовательным процессам предшествует активная транскрипция района ДНК и формирование нкРНК [1-2].

В дальнейшем планируется исследовать функции белка Lawc и некодирующих *lawc*-транскриптов в экспериментах по избирательному подавлению (нокдаун гена) его экспрессии по пути РНК-интерференции. Молекулярно-генетические конструкции для этих экспериментов уже созданы. Также будут созданы управляемо экспрессирующие Lawc-белок конструкции, которые будут использоваться в экспериментах по "спасению" фенотипа предполагаемых *lawc*-мутантов.

Изучение генов, возникших *de novo*, важно не только для понимания их функционального и биологического вклада в видообразование - они также несут информацию и расширяют наши представления о направлении вектора эволюции генома и специализации новых генов, которые, благодаря отбору, должны улучшать адаптацию организма к условиям обитания.

1.5 Список использованных источников

1. **Cherezov R.O., Vorontsova Ju.E., Simonova O.B.** The phenomenon of evolutionary “de novo generation” of genes // Rus. J. Dev. Biol. – 2021. - Vol. 52. - No. 6. - P. 395–405. DOI: 10.1134/S1062360421060035 – Q4 – отчетная публикация.
2. Stasevich E.M., Murashko M.M., **Zinevich L.S.**, Demin D.E., Schwartz A.M. The role of noncoding RNAs in the regulation of the proto-oncogene MYC in different types of cancer // Biomedicines. – 2021. - V. 9. - P. 921. doi.org/10.3390/biomedicines9080921 – Q1– отчетная публикация.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. - 1990. – V. 215. – P. 403-410.
4. Zimmermann L., Stephens A., Nam S.Z., Rau D., Kübler J., Lozajic M., Gabler F., Söding J., Lupas A.N., Alva V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core // J. Mol. Biol. - 2018. - V.430. – P. 2237-2243.

5. Gabler F., Nam S.Z., Till S., Mirdita M., Steinegger M., Söding J., Lupas A.N., Alva V. Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit // Curr. Protoc. Bioinformatics. – 2020. – V. 72(1) - e108. doi: 10.1002/cpbi.108.
6. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. - 1997. - V. 25. – P. 3389-3402.
7. Rost B., Yachdav G., Liu J. The PredictProtein server // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32 – P. W321-W326. doi: 10.1093/nar/gkh377.
8. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. Pfam: The protein families database in 2021 // Nucleic Acids Res. – 2021. – V. 49. – P. - D412–D419 doi: 10.1093/nar/gkaa913.
9. Michel A.M., Fox G., Kiran A.M., De Bo C., O'Connor P.B.F., Heaphy S.M., Mullan J.P.A., Donohue C.A., Higgins D.G., Baranov P.V. GWIPS-viz: development of a ribo-seq genome browser // Nucleic Acids Res. 2014. – V. 42. – P. D859–D864. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1035>.
10. Dunn J.G., Foo C.K., Belletier N.G., Gavis E.R., Weissman J.S. Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster* // eLife. - 2013. -V.2 - e01179. doi: 10.7554/eLife.01179.

РАЗДЕЛ 2. РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА D4 В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА

2.1 Введение

Ген *toothrin* (*tth*) относится к эволюционно консервативному семейству генов *d4*. У позвоночных животных семейство представлено тремя генами, два из которых дифференциально экспрессируются в центральной и периферической нервной системе [1]. У дрозофилы обнаружено два гена-гомолога этого семейства, но только один из них (*drosophila d4 – dd4*) кодирует белок с характерным С-концевым доменом парных цинковых пальцев PHD-типа, или D4-доменом (DPF). Было показано, что D4-домен белка DPF3/Cer-D4 человека способен связываться с метилированными и ацетилированными остатками лизинов гистонов 3 и 4 [2]. Ранее мы показали специфический паттерн экспрессии мРНК гена *dd4* в нервной системе и гонадах эмбрионов дрозофилы [3]. Другой ген - *tth* - является особым геном, кодирующим белок без домена D4, но с доменом 2/3, который также есть у D4-белков. Однако паттерн экспрессии ТТН исследован не был. По литературным данным домен 2/3 белка DPF3 семейства D4 человека играет роль ко-активатора транскрипции в сигнальном пути NF- κ B, задействованном в воспалительном ответе, пролиферации клеток и апоптозе [4]. Наличие гена, кодирующего белок только с доменом 2/3, даёт возможность изучать роль этого домена и самого гена в онтогенезе на модельном организме *Drosophila melanogaster*.

Цель работы в 2021 году состояла в изучении картины экспрессии белка ТТН на личиночной стадии развития дрозофилы в имагинальных дисках и нервной системе. Для этого мы получили специфические к ТТН антитела. Дополнительно, для более точного детектирования и визуализации продуктов его экспрессии *in vivo* мы получили линию дрозофил, трансформированных генетической конструкцией, экспрессирующей белок ТТН, меченый GFP.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Получение поликлональных антител к белку ТТН

Кроликов иммунизировали рекомбинантным белком, который состоял из последовательности С-концевых аминокислотных остатков (71 а.к.о.) белка ТТН дрозофилы, полученной в бактериальной системе экспрессии *E. coli* (вектор pET-15b, Novagen). Антитела были очищены с помощью аффинной колонки, синтезированной на основе эпокси-активированной сефарозы 4В (GE healthcare), конъюгированной с рекомбинантным белком ТТН.

2.2.2 Синтез конструкции, экспрессирующей гибридный белок ТТН::GFP

Синтез конструкции, несущей модифицированный ген *tth* мы осуществили в несколько этапов. На первом этапе была получена донорная конструкция. Для этого ген-репортер *GFP* встраивали в плазмидный вектор *pBlueskript*, содержащий клонированный в него ген устойчивости к канамицину, окруженный сайтами *LoxP* для Cre-специфической рекомбинации, и в полученную плазмиду клонировали фрагменты ДНК из области выше и ниже стоп-кодона *tth* («плечи»). Второй этап представлен на рисунке 2.1.

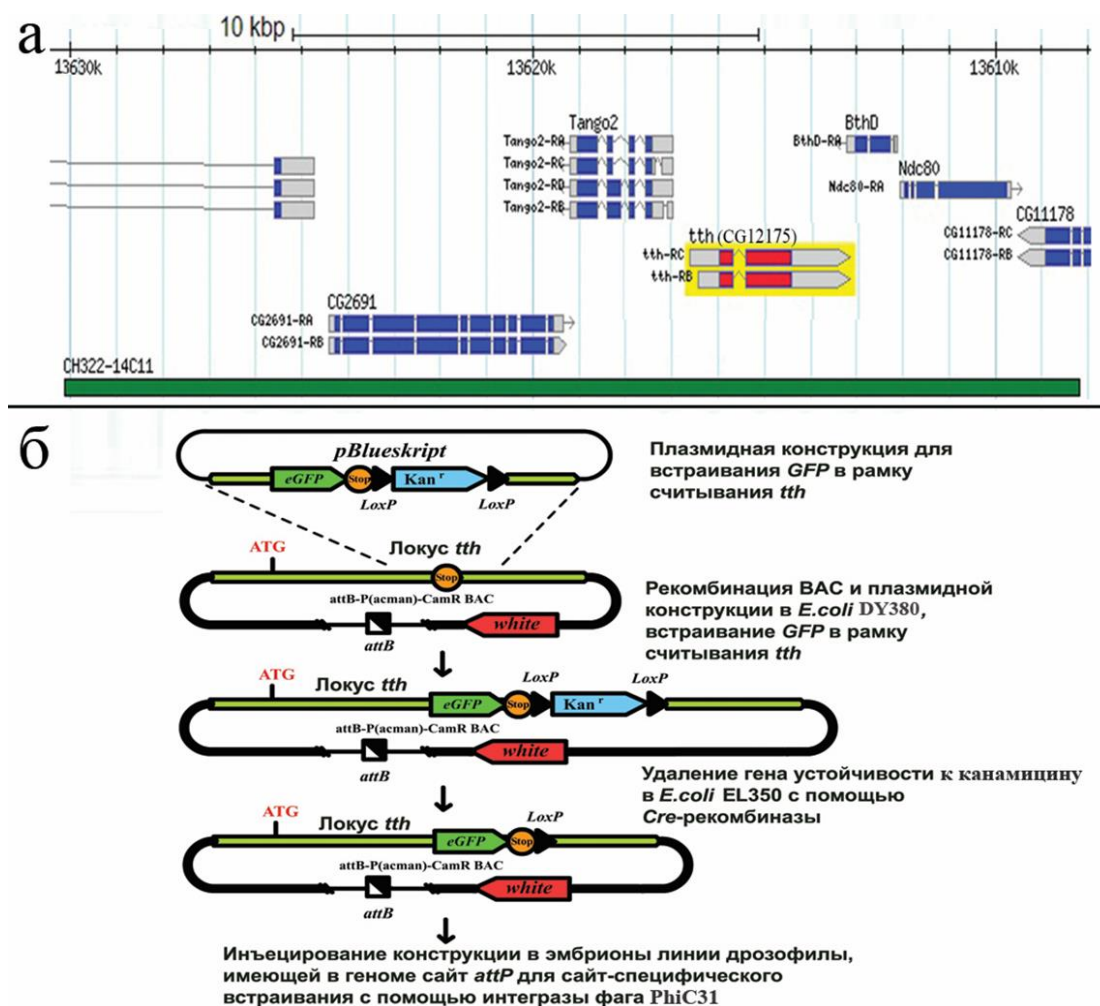


Рисунок 2.1 - Локализация гена *tth* и схема синтеза конструкции ТТН::GFP

(а) - район локализации гена *tth* (выделен красным) на геномной карте *D. melanogaster*, взятой из P[acman] Genome Browser (<https://bacpacresources.org>). CH322-14C11 - границы ВАС (CH322-14C11) (выделены зелёным); (б) - схема создания конструкции для экспрессии белка ТТН, несущего С-концевую модификацию GFP. *attB-P(acman)-CamR* ВАС - бактериальная искусственная хромосома ВАС (CH322-14C11), транскрибируемая область гена *tth* выделена зеленым. **Обозначения:** *attB*-сайт для сайт-специфической рекомбинации с *attP* сайтом, *eGFP*-зеленый флуоресцентный белок, *white* – маркерный ген, ответственный за пигментацию глаз дрозофилы, *Kan^r* – ген устойчивости к канамицину, *LoxP* - сайт для Cre-рекомбиназы, оранжевым кругом обозначен стоп-кодон.

Полученную донорную конструкцию встраивали в искусственную бактериальную хромосому ВАС (клон CH322-14C11 из BACPAC Resources Center - <https://bacpacresources.org>), содержащую локус *tth* в фрагменте геномной ДНК размером 21,195 т.п.о. При встраивании ген-репортер *GFP* попадает в рамку считывания гена *tth* со стороны 3'-концевой области. Внесение репортерных последовательностей в ВАС-клон проводили по протоколу [5]. С помощью электропорации модифицированный ВАС-клон трансфецировали в клетки DY380. Трансформированные клетки выращивали при 30°C, затем инкубировали при 42°C 15 мин. для индукции высокой рекомбинантной активности и делали их электрокомпетентными. Затем клетки электропорировали линейаризованной донорной плазмидной конструкцией для внесения в локус последовательности репортерного гена. Встраивание контролировали по появлению устойчивости к канамицину. Далее ген устойчивости к канамицину удаляли рекомбинацией *Cre/Lox* в штамме EL350. Правильно прошедшую рекомбинацию подтверждали с помощью ПЦР соответствующей области и секвенирования ПЦР-фрагмента. В результате модифицированный *tth* кодировал гибридный рекомбинантный белок ТТН::*GFP*, содержащий *GFP* на С-конце.

2.2.3 Получение трансгенных дрозофил, экспрессирующих гибридный белок ТТН::*GFP*

Полученный в описанных выше экспериментах ВАС-клон, имеющий в своем составе сайт *attB* для сайт-специфической рекомбинации (*attB/attP*) и маркер *miniwhite* для отбора трансформантов дрозофилы, наращивали в клетках EPI300 и выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Cat.no. 12143). ДНК модифицированного ВАС-клона инъецировали в полярную плазму часовых эмбрионов дрозофилы линии *attP2* ($y^1 w^{67c23}; P\{y^{+t7.7}=CaryP\}attP2$ DBSC #8622), мутантных по гену *white* и содержащих сайт *attP* для встраивания по нему *attB*-конструкций с помощью рекомбиназы Phic31. Трансформантов выводили в линию гомозиготных дрозофил и использовали для исследования картины экспрессии гибридного белка ТТН::*GFP* в тканях и органах личинок.

2.2.4 Приготовление препаратов и иммуноокрашивание

Имагинальные диски, слюнные железы и центральную нервную систему выделяли из личинок третьего возраста в PBS, фиксировали 20 мин в растворе 4% параформальдегида в PBS на льду и отмывали в PBS. Окрашивали препарированные органы личинок третьего возраста, экспрессирующих бактериальную β -галактозидазу гена *lacZ* в глиальных клетках и клетках слюнных желёз (*repo>lacZ*). Для окрашивания X-gal использовали реакционную смесь: 3 mM $K_4[FeII(CN)_6]$, 3 mM $K_3[FeIII(CN)_6]$, 1 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 0.25% X-gal в

фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением 0.3% Triton-X100. Развитие окраски наблюдали в течение часа и останавливали, отмывая 3 раза в PBS. Далее проводили иммунохимическое окрашивание антителами к ТТН, конъюгированными с пероксидазой хрена, по изложенному в руководстве протоколу [6]. Первичные кроличьи антитела против ТТН добавляли в разведении 1:25. В качестве вторичных использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с HRP (пероксидаза хрена). Для окрашивания HRP добавляли раствор 0.5 mg/ml диаминобензидина (DAB) в PBS с 0.06% H₂O₂. Как негативный контроль использовали линию дрозофил с делецией гена *tth*.

2.2.5 Микроскопия

Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscope 40 в проходящем свете после иммунохимического окрашивания, и с использованием флуоресцентных светофильтров при длине волны 509 для препаратов с GFP-флуоресценцией.

2.3 Результаты и обсуждение

Сначала особенности экспрессии ТТН изучали с помощью иммунохимического окрашивания с использованием полученных нами специфических антител против ТТН. Оказалось, что белок локализован в ядрах клеток глазо-антенного имажинального диска, нервной системы (мозг и торакальный ганглий) и в личиночных секреторных органах: в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. В своих экспериментах мы использовали личинок, экспрессирующих ген *lacZ* в глиальных клетках (*repo>LacZ*). Это позволило сравнить картины экспрессии ТТН и β-галактозидазы (продукт *LacZ*) в нервной системе. Оказалось, что паттерн экспрессии белка ТТН не совпадает с экспрессией β-галактозидазы (рисунок 2.2 б-г). Это говорит о том, что белок ТТН экспрессируется в основном в нейронах.

Тем не менее в тканях с низкой экспрессией белка окраска антителами не всегда эффективна. Чтобы это предусмотреть, мы провели дополнительные эксперименты по получению линии трансгенных дрозофил, экспрессирующих GFP-меченый гибридный белок ТТН::GFP (материалы и методы). Флуоресцентные белки широко используются как репортеры для высокочувствительного молекулярного анализа *in vitro* и *in vivo*. На основе бактериальной искусственной хромосомы (BAC) мы получили генетическую конструкцию, в которой в одной рамке считывания последовательно располагались участки, кодирующие биоспецифический и репортерный белки (материалы и методы). Далее мы получили трансгенных дрозофил, несущих модифицированный ген *tth*, экспрессирующий гибридный белок ТТН::GFP (материалы и методы).

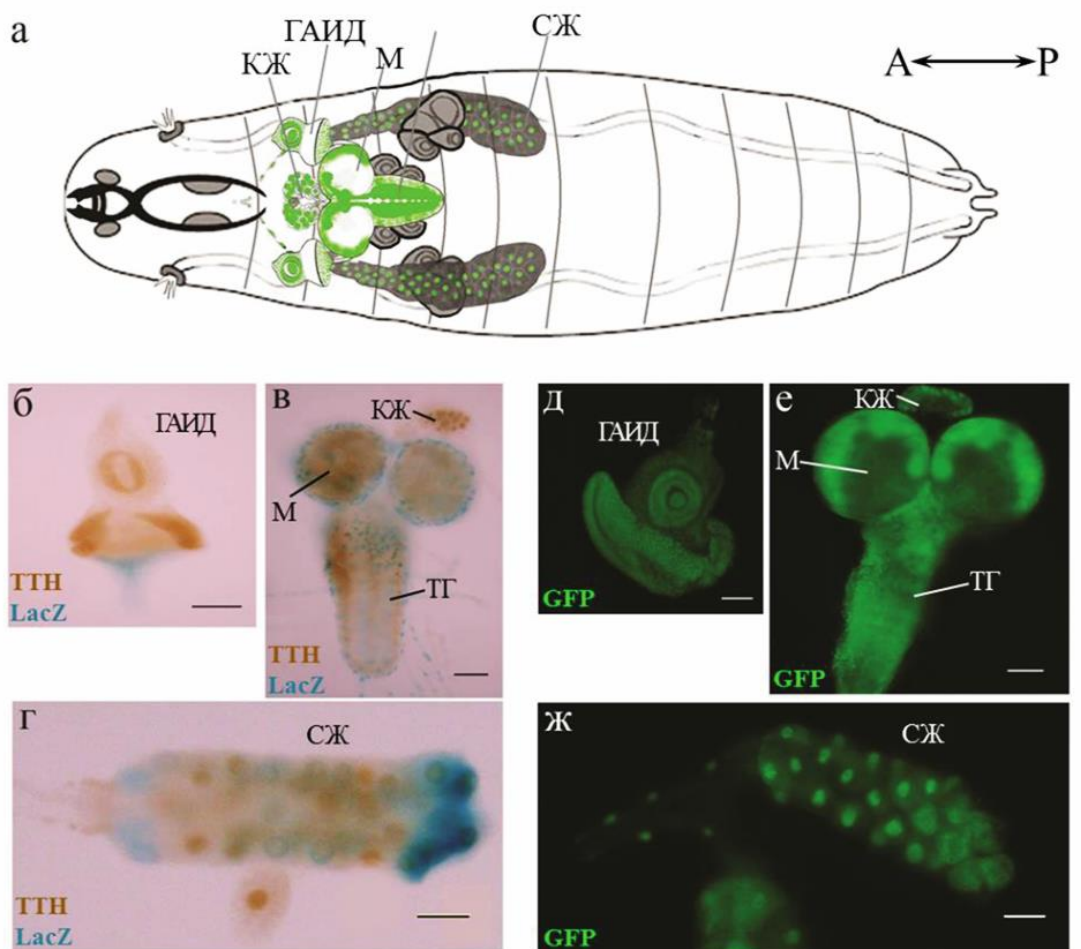


Рисунок 2.2 - Картина экспрессии белка ТТН и гибридного белка ТТН::GFP на личиночной стадии развития *D. melanogaster*

(а) - схема личинки дрозофилы третьего возраста, зелёным отмечена экспрессия ТТН::GFP; (б-г) - иммунохимическое окрашивание антителами против ТТН (коричневый цвет) и окраска X-gal глиальных клеток и слюнной железы личинок *repo>LacZ* (голубой); (д-ж) - прижизненная визуализация органов личинки, экспрессирующей белок ТТН::GFP (зелёный). Обозначения: КЖ - кольцевая железа, ГАИД - глазо-антенный имагинальный диск, М - мозг, ТГ - торакальный ганглий, СЖ - слюнная железа. Масштабная полоска – 50 мкм.

Прижизненная визуализация экспрессии белка ТТН::GFP показала, что его распределение и локализация соответствует результатам, полученным с использованием специфических антител (рисунок 2.2). Это говорит о том, что дополнительный локус *tth* (длиной 22 т.п.о.), функционирует как эндогенный. Мы установили, что ТТН::GFP экспрессируется в ядрах клеток слюнных желёз, кольцевой железы, хордотональных органах кутикулы, клетках органа Болвига, нейронах зрительной области ЦНС (в нейронах ламины), нейронах центрального нейропилия, а также в глазо-антенном имагинальном диске

(дающем начало зрительным и обонятельным органам взрослого насекомого) и глазном стебельке (мембраны аксонов фоторецепторных нейронов).

Таким образом, мы впервые описали паттерн экспрессии белка ТТН у модельного организма *D. melanogaster* и показали, что экспрессия этого белка прежде всего связана с нервной системой и структурами, отвечающими за формирование зрительного аппарата взрослого насекомого (глазо-антенный диск, орган Болвига, оптические доли мозга), а также с эндокринными (кольцевая и слюнные железы) органами личинок.

Известно, что белки семейства D4 входят в состав хроматин-ремоделирующих SWI/SNF-подобных комплексов BAP, которые по субъединичному составу соответствуют комплексам nBAF млекопитающих [7]. Комплексы nBAF характерны для дифференцированных постмитотических нейронов, но не для нейральных клеток-предшественников [8]. Наши эксперименты показали, что родственный семейству D4 продукт гена *tth*, имеющий в своём составе только домен 2/3, локализуется в нейронах и нейробластах. Локализация нативного ТТН и ТТН::GFP в ядрах клеток подтверждает функциональность сайта ядерной локализации, который характерен для домена 2/3, благодаря чему белки семейства D4 могут транспортироваться в ядро, например, в период развития нервной системы у высших организмов.

Локализация ТТН в тканях кольцевой железы может свидетельствовать о вовлеченности этого белка в процесс гормональной регуляции развития дрозофилы, что согласуется с нашими ранними данными о влиянии экспрессии *tth* на скорость развития [9]. Высокая консервативность белковых доменов семейства D4 дрозофилы позволит экстраполировать их функцию на млекопитающих. У позвоночных животных нет генов, кодирующих белки без домена D4, однако существуют сплайс-варианты гена *cer-d4* (*DPF3*), кодирующие подобные изоформы. По нашим данным, а также по данным MGI (Mouse Gene Expression Database <http://www.informatics.jax.org>), именно этот ген экспрессируется в сетчатке глаза мыши на очень высоком уровне.

2.4 Заключение

Анализ экспрессии ТТН в имагинальных дисках, мозге и органах личинок дрозофилы показал, что этот белок локализован в ядрах нейронов мозга, а также в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. Таким образом, на основе наших предварительных данных можно предположить, что ген *tth* участвует в развитии центральной и периферической нервной системы, и в частности, зрительных органов, а также в развитии и функционировании органов секреции, контролирующих гормональную регуляцию и пищеварение *D. melanogaster*.

Для продолжения исследования роли ТТН в развитии и функционировании нервной системы, мы планируем изучить особенности экспрессии ТТН у дрозофилы на фоне известных белковых маркеров нейронов ЦНС, включая нейроны сетчатки зрительных органов.

2.5 Список использованных источников

1. Kulikova D.A., Mertsalov I.B., Simonova O.B. *d4* family genes: Genomic organization and expression // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 1-6.
2. Lange M., Kaynak B., Forster U.B. et al. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex // Genes Dev. 2008. V. 22(17). P. 2370-2384.
3. Nabirochkina E., Simonova O.B., Mertsalov I.B. et al. Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // Mech. Dev. 2002. V. 114. P. 119-123.
4. Ishizaka A., Mizutani T., Kobayashi K. et al. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer // J. Biol. Chem. 2012. V. 287(15). P. 11924-11933.
5. Venken K.J., Kasprówicz J., Kuenen S., et al. Recombineering-mediated tagging of *Drosophila* genomic constructs for *in vivo* localization and acute protein inactivation // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36 (18). P. e114.
6. Patel N.H. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes // Methods in Cell Biol. 1994. V. 44. P. 445-87.
7. Moshkin Y.M., Chalkley G.E., Kan T.W. et al. Remodelers organize cellular chromatin by counteracting intrinsic histone-DNA sequence preferences in a class-specific manner // Mol. Cell. Biol. 2012. V. 32(3). P. 675-88.
8. Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A. et al. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // Neuron. 2007. V. 55(2). P. 201-15.
9. Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы // Генетика. 2005. Т. 41. N 2. С. 196-202.

РАЗДЕЛ 3. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

3.1 Введение

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) является высококонсервативным лиганд-зависимым транскрипционным фактором [1]. Гены-мишени AHR играют важную роль в регуляции развития организма, детоксикации экзогенных и эндогенных токсинов и поддержании гомеостаза в эукариотических клетках [2-4]. Попадая в цитоплазму, лиганд взаимодействует с AHR и активирует его. Далее, активированный AHR перемещается в ядро, где вместе с ARNT (AHR Nuclear Translocator) формирует транскрипционный комплекс AHR::ARNT и контролирует работу своих генов-мишеней.

На предыдущем этапе в экспериментах *in vivo* на дрозофиле мы обнаружили связь между сигнальным путём активации генов-мишеней AHR и системой эпигенетической регуляции экспрессии генов. Впервые было показано, что повышение уровня мРНК генов-мишеней AHR на фоне лигандов-ксенобиотиков опосредовано действием гистоновых метилтрансфераз, гистоновых ацетилтрансфераз и гистонового шаперона CG5017/Hanabi [5-6]. То есть, эффективность лиганд-зависимого AHR-сигнального пути может регулироваться на уровне структуры хроматина генов-мишеней, в частности, посредством ключевых эпигенетических комплексов Polycomb Repressive Complex 1 и 2 и нуклеотропного шаперона, принадлежащего семейству NAP1. Это открытие объясняло загадочное отсутствие реакции ряда генов-мишеней AHR в ответ на действие лигандов-ксенобиотиков в некоторых органно-тканевых структурах преимущественно после завершения морфогенеза. Эти эксперименты мы проводили в нормальных условиях. Однако, как ведёт себя AHR-сигнальный путь в условиях канцерогенеза и влияют ли на него эпигенетические факторы, исследовано не было. Кроме того, ингибиторы гистоновых модификаторов и лиганды AHR часто входят в состав лекарственных препаратов, которые используют при лечении разных типов рака [7-9], поэтому изучение способности генов-мишеней AHR реагировать в ответ на действие этих агентов в опухолевых клетках является актуальной задачей. Мы поставили цель этапа 2021 года - исследовать значение эпигенетических факторов в регуляции транскрипции генов-мишеней AHR человека в культуре клеток глиобластомы. В качестве генов-мишеней были выбраны гены, кодирующие ферменты системы цитохрома р450 (CYP). Мы выбрали эти гены, поскольку они являются наиболее изученными генами-мишенями AHR и участвуют в метаболизме гормонов и лекарственных соединений. Известно, что для многих опухолевых клеток

характерно изменение соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности по сравнению с неопухолевыми, что может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами [3-4, 10-11]. Мы исследовали влияние ингибитора гистоновой деацетилазы HDAC, белиностата, который не так давно начали рассматривать, как возможное терапевтическое средство для лечения различных типов глиом, в том числе и глиобластом [8, 12] на индукцию лигандами AHR экспрессии его мишеней - генов семейства *CYP1* (*CYP1A1*, *CYP1B*), уровень экспрессии самого гена *AHR* и его партнера, *ARNT*.

3.2 Материалы и методы

Для анализа использовали клетки эмбриональной почки человека линии HEK293 и опухолевые клетки глиобластомы человека линии Sus\fp2 [13]. Для культивирования клеток использовали клеточную среду DMEM/F12, содержащую 10% FBS с добавлением 2 mM L-глутамина и 19,4 mM D-глюкозы (ПанЭко, Россия) при 37 °C и 5% CO₂.

Для проведения экспериментов клетки рассеивали на 6-ти луночные планшеты и инкубировали 24 часа, после чего в клеточную среду добавляли отдельно либо лиганд, либо белиностат, либо их комбинацию и инкубировали 24 часа. Лиганды и белиностат растворяли в ДМСО для получения стоковой концентрации: 10 мкМ для 2'Z-индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия) и 2 мМ белиностата (PXD101, Sigma-Aldrich, США). Далее в среде их доводили до конечной концентрации: 10 нМ для индирубина, 100 мкМ для индол-3-карбинола и 2 мкМ для белиностата. В качестве контроля использовали среду с эквивалентным количеством ДМСО.

Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy (Qiagen, Германия) по протоколу фирмы производителя, обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени - с помощью набора реактивов qPCRmix-HS-HighRox (Евроген, Россия). Реакцию ставили в амплификаторе Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Уровень экспрессии генов оценивали с помощью ПЦР в реальном времени по значению $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, т.е. через отношение экспрессии целевого гена к генам домашнего хозяйства *HPRT1* и *GAPDH*. В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой – TGCACCACTGCTTAGC, обратный – GGCATGGACTGTGGTCATGAG; для гена *HPRT1*: прямой – TGAGGATTTGAAAGGGTGT, обратный – GAGCACACAGAGGGCTACAA; для гена *AHR*: прямой – GAACCATCCCCATACCCAC, обратный – TGGCTGGCACTGATACATCG; для гена *ARNT*: прямой –

GAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAG, обратный – AGGAGTCACGGAGTCAGACACATA; для гена *CYP1A1*: прямой – GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC, обратный – CCAAAGAGGTCCAAGACGATGTTA; для гена *CYP1B*: прямой – CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC, обратный – AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью REST program software (Qiagen, USA). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

3.3 Результаты и обсуждение

Применение лигандов по-разному влияло на экспрессию исследуемых генов. Экспрессия гена *CYP1A1* при добавлении индирубина увеличивалась незначительно по сравнению с контролем (рисунок 3.1 В). После добавления индол-3-карбинола уровень экспрессии *CYP1A1* увеличивался значительно, в 4,5 и в 19 раз, в клетках линии неопухолевого происхождения HEK293 и в клетках глиобластомы Sus/fP2 соответственно.

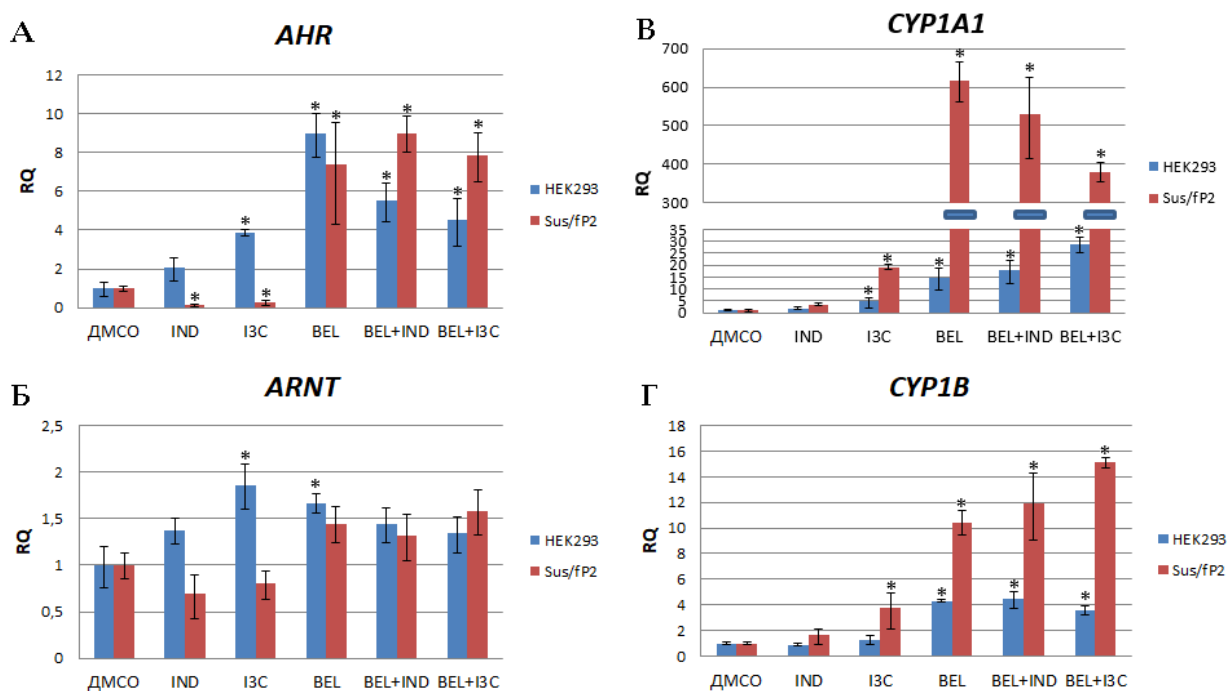


Рисунок 3.1 - Уровень экспрессии генов *CYP1A1*, *CYP1B*, *AHR* и *ARNT* в клетках линии неопухолевого происхождения HEK293 и глиобластомы Sus/fP2 до (контроль) и после добавления лигандов (индирубина, индол-3-карбинола) и белиностата, ингибитора гистоновой деацетилазы HDAC

Звездочка указывает на значимое различие в экспрессии генов по сравнению с контролем (* $p \leq 0,05$). RQ – относительный уровень мРНК. ДМСО – контроль, IND - индирубин, I3C – индол-3-карбинол, Bel – белинонат.

Индукция гена *CYP1B* после добавления лигандов происходила только при добавлении индол-3-карбинола в клетках Sus/fP2 (рисунок 3.1 Г).

CYP1A1 и *CYP1B* являются генами-мишенями лиганд-зависимого транскрипционного фактора AHR. Индукция их экспрессии после добавления лигандов AHR указывает на нормальное функционирование пути *AHR/CYP1* в исследуемых клеточных культурах.

Воздействие лигандов так же приводило к увеличению экспрессии самого *AHR* в клетках линии HEK293 и к значительному снижению экспрессии в клетках линии Sus/fp2 (рисунок 3.1 А). Тогда как на экспрессию ARNT применение лигандов практически не оказывало эффекта (рисунок 3.1 Б).

Добавление к культивируемым клеткам белиностата, который является ингибитором гистоновой деацетилазы HDAC, приводило к индукции транскрипции *AHR* и усилению экспрессии всех исследуемых генов, кроме ARNT (рисунок 3.1). Возможно HDAC не участвует в регуляции активности промотора гена *ARNT* в клетках исследуемых культур. Для гена *AHR* было показано, что ингибиторы HDAC могут усиливать конститутивную активность его промотора, тем самым повышая уровень его экспрессии [14], что подтверждается нашими данными.

Самое значительное (в 600 раз) повышение экспрессии было зафиксировано для гена *CYP1A1* в клетках глиобластомы. Интересно, что белиностат значительно сильнее влиял на индукцию генов-мишеней AHR в клетках глиобластомы Sus/fp2, чем в клетках неопухолевой культуры HEK293 (рисунок 3.1).

Более низкую индукцию *AHR* и его генов-мишеней в ответ на действие белиностата в культуре HEK293 по сравнению с культурой глиобластомы можно объяснить особенностями клеток HEK293 и ткани, из которой они получены. Как было показано ранее, молекулярные механизмы, инициированные во время воздействия белиностата, могут сильно зависеть от типа опухолевых клеток [12].

Таким образом, в клетках опухолевого и неопухолевого происхождения, в которых работает путь *AHR/CYP1*, способность генов-мишеней реагировать на активацию AHR лигандами зависит от статуса хроматина их регуляторных зон и активности эпигенетических факторов.

3.4 Заключение

Механизм и принцип действия белиностата на данный момент понятен не до конца, хотя известно, что он является ингибитором гистоновой деацетилазы HDAC, которая подавляет экспрессию генов на эпигенетическом уровне через модификацию гистонов промоторных областей. Однако до сих пор не выявлен полный спектр генов, экспрессию которых белиностат может контролировать в опухолевых и неопухолевых клетках. Тем не

менее, известно его прямое влияние на экспрессию генов, продукты которых ответственны за арест клеточного цикла и апоптоз, что важно для онкотерапии [12]. На этапе 2021 года мы показали, что белинонат также активирует экспрессию гена *AHR* и двух его генов-мишеней в клетках глиобластомы, усиливая действие лигандов *AHR*. Так как лиганды *AHR* и эпигенетические ингибиторы используются в противоопухолевой терапии разных видов рака, в том числе глиобластом [15], результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний.

3.5 Список использованных источников

1. Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution // Chem. Biol. Interact. -2002. - V. 141. - P. 131–160.
2. Zatsepina O.G., Nikitina E.A., Shilova V.Y., Chuvakova L.N., **Sorokina S., Vorontsova J.E.**, Tokmacheva E.V., Funikov S.Y., Rezvykh A.P. & Evgen'ev M.B. Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster* // Cell Stress and Chaperones. 2021. - V.26(3). – P. 575-594 <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01203-7> (WoS, Scopus) - **Q3 –отчетная публикация**
3. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer // Oncogene. 2006. – V.25. – P. 1679–1691.
4. Nebert DW. The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects // Crit. Rev. Toxicol. – 1989. – V.20. P.153–174.
5. Акишина А.А., Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О. и др. Эпигенетическая модуляция транскрипции генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора человека в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // Биомика. - 2020. - Т. 12. - С. 504-509.
6. Akishina A., Vorontsova J., Cherezov R. et al. Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // Oncotarget. - 2017. - V. 8. - P. 102934-102947.
7. Howells L.M., Gallacher-Horley B., Houghton C.E. et al. Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line // Mol. Cancer. Ther. - 2002. - V. 1. - P. 1161-1172.
8. Gurbani S.S., Yoon Y., Weinberg B.D. et al. Assessing Treatment Response of Glioblastoma to an HDAC Inhibitor Using Whole-Brain Spectroscopic MRI // Tomography. - 2019. - V. 5. - P. 53-60.
9. Wang Y., Hoi P.M., Chan J.Y.-W. et al. New perspective on the dual functions of indirubins in cancer therapy and neuroprotection // Anticancer Agents Med. Chem. - 2014. - V. 14. - P. 1213–1219.

10. Воронцова Ю.Е., Акишина А.А., Черезов Р.О. и др. Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2020. – Т. 75. – С. 291-295.
11. Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б. Арил-гидрокарбоновый рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии // Биомедицинская химия. - 2018. - Т. 64. - С. 397-415.
12. Kusaczuk M., Krętowski R., Stypułkowska A. et al. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report // Invest. New Drugs. - 2016. - V. 34. - P. 552-564.
13. Pustogarov N., Panteleev D., Goryaynov S. et al. Hiding in the shadows: CPOX expression and 5-ALA induced fluorescence in human glioma cells // Mol. Neurobiol. - 2017. - V. 54. - P. 5699–5708.
14. Garrison P.M., Rogers J.M., Brackney W.R. et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter // Arch. Biochem. Biophys. - 2000. - V. 374. - P. 161-171.
15. Sherer C., Tolaymat I., Rowther F. et al. Preliminary SAR on indole-3-carbinol and related fragments reveals a novel anticancer lead compound against resistant glioblastoma cells // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2017. - V. 27. - P. 1561-1565.

РАЗДЕЛ 4. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА

4.1 Введение

Ранее мы выдвинули гипотезу, что при увеличении размера группы модификации гистонов до размеров сравнимых с размерами гистонов, например, убиквитилирование и сумоилирование, (i) происходят критические структурные искажения и крупномасштабные изменения структуры и динамики нуклеосом. Эти эффекты могут дополнительно модулироваться положительными или отрицательными стрессами ДНК, и (ii) добавленная масса может стимулировать спонтанное, временное и обратимое увеличение динамики гистонов, позволяя ферментам, функционирующим на ДНК, легче проходить через нуклеосомы [1, 3-4]. Таким образом, концепция «гистонового кода» может быть расширена новым способом действия, с помощью которого модификации гистонов напрямую регулируют структуру и динамику нуклеосом и, таким образом, регулируют функциональность.

Многие заболевания и когнитивные расстройства человека, включая рак, метаболические аномалии, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, аутоиммунные заболевания являются результатом дерегуляции генов [5]. Генетическая информация эукариот существует в форме хроматина. Не только эухроматин, но и гетерохроматин прицентромерных районов динамичен и отчасти транскрипционно активен у организмов разных видов [6]. Основные повторяющиеся единицы хроматина, нуклеосомы, состоят из ДНК длиной 200 п.н., дважды обернутой вокруг октамерного гистонового ядра содержащего один тетрамер H3-H4, фланкированный двумя димерами H2A-H2B (рисунок 4.1).

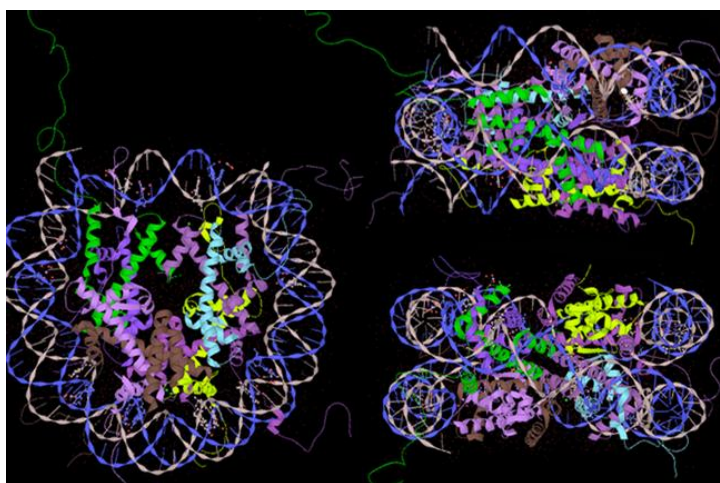


Рисунок 4.1 - Нуклеосома (1kx5) вид спереди, сверху и сбоку

● H3.2 (chains A,E), ● H2B 1.1 (chains D,H), ● H2A type 1 (chains C,G) ● H4 (chains B,F)

Нуклеосомы, стабилизированные множеством белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий, статичны в своем «каноническом» состоянии и ограничивают функциональность ДНК. Несмотря на схожий состав и организационные принципы, нуклеосомы в активном хроматине заметно отличаются от канонических. Они демонстрируют высокую степень структурной динамики и конформационной подвижности, их структурная пластичность позволяет им перестраиваться таким образом, что сульфгидрилы гистона H3, окклюзированные в каноническом состоянии, становятся доступными извне [7]. Транскрибированные нуклеосомы могут обмениваться H2A-H2B-димерами, и практически «прозрачны» для РНК-полимераз, которые транскрибируют последовательности генов с такой же скоростью как и на свободной от гистонов «чистой» ДНК [8].

Хроматин в значительной степени регулируется множественными обратимыми посттрансляционными модификациями (ПТМ) гистонов, которые «...воздействуя комбинаторным или последовательным образом на один или несколько гистонов, определяют уникальную нисходящую функцию» (концепция «гистонового кода» [9]). ПТМ варьируются от «малых» химических групп (фосфорилирование, ацетилирование) до «объемных» остатков убиквитина и сходных «убиквитин-подобных» белков (SUMO)-1,2/3 [1] (рисунок 4.2).

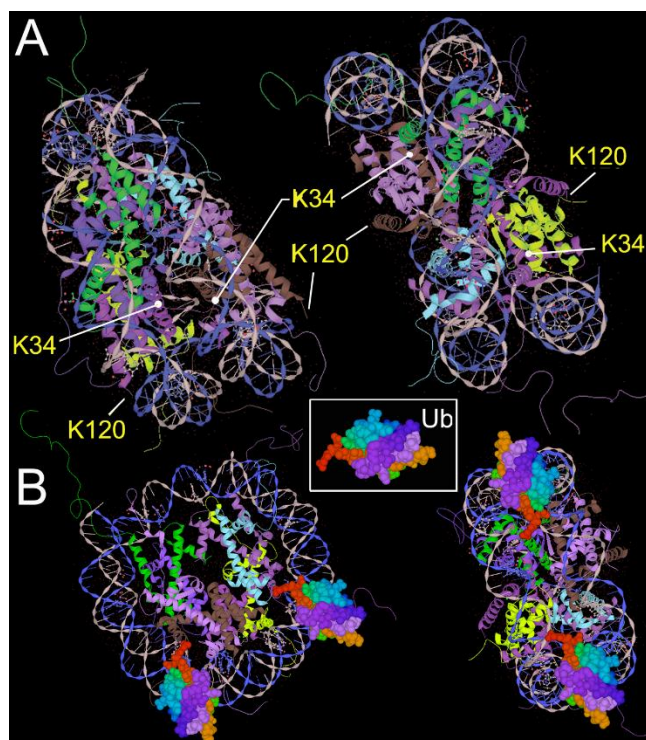


Рисунок 4.2 - Структура нуклеосом при разных модификациях гистонов
 А – положения метильных модификаций лизина H2B K34/K120 в положениях 34 и 120 (обозначены). В – положения модифицированных убиквитином лизина H2BK34-ub в положении 34, в рамке показан убиквитин (Ub). Адаптированный рисунок 2В из [1].

ПТМ могут играть регулирующую роль непосредственно - стимулируя добавление или удаление других РТМ посредством перекрестного взаимодействия между концевыми доменами гистонов. Однако до сих пор неясно, как «код» ПТМ гистонов «транслируется» в дерепрессию нуклеосомной ДНК.

Классические модели предполагают, что ПТМ действуют несколькими способами: (i) обеспечивая платформу связывания для регуляторных белков и (ii) изменяя заряды концевых доменов, которые влияют на межнуклеосомные взаимодействия и упаковку хроматина в структуры более высокого порядка. Кроме того, модулируя заряды гистонов и незначительно добавляя стерическую массу, «малые» химические ПТМ на входе-выходе ДНК могут умеренно модулировать структурные флуктуации нуклеосом без заметного влияния на стабильность нуклеосом, в то время как ПТМ в центральной области нуклеосом (область, значимая для стабильности нуклеосомы) могут ослаблять ДНК-гистоновые взаимодействия и незначительно снижать стабильность нуклеосомы без значительного влияния на флуктуации нуклеосомы. Напротив, «объемные» ПТМ близки по размеру к гистонам и, теоретически, могут оказывать значительное прямое воздействие на нуклеосомы (рисунок 4.3). Однако структурные последствия этих воздействий для нуклеосом еще недостаточно определены. В наших предыдущих исследованиях мы показали с помощью биохимических подходов, что убиквитилирование гистонов H2B по остаткам лизина K34 или K120 (рисунок 4.3) может резко увеличить динамику нуклеосом и способствовать диссоциации одного из димеров H2A-H2B с образованием «гексасом», тем самым формируя «структурный код» активности генов, в дополнение к упомянутому «сигнальному» коду [1, 4].

Целью работы являлось исследование влияния модификаций гистонов на структурно-функциональные характеристики хроматина. Задача этапа в 2021 г. состояла в исследовании влияния убиквитилирования гистонов H2B по остаткам лизина K34/K120 на молекулярную динамику реконструированных *in vitro* нуклеосом. Следует отметить, что это достаточно новая обширная область исследований, и полученные результаты являются лишь начальными попытками изучить принципы регулирования структуры и функций хроматина за счет «объемных» модификаций ('bulky' modifications) гистонов. Конкретно в 2021 г. мы провели исследование динамики реконструированных *in vitro* H2Bub-нуклеосом с помощью молекулярной спектроскопии.

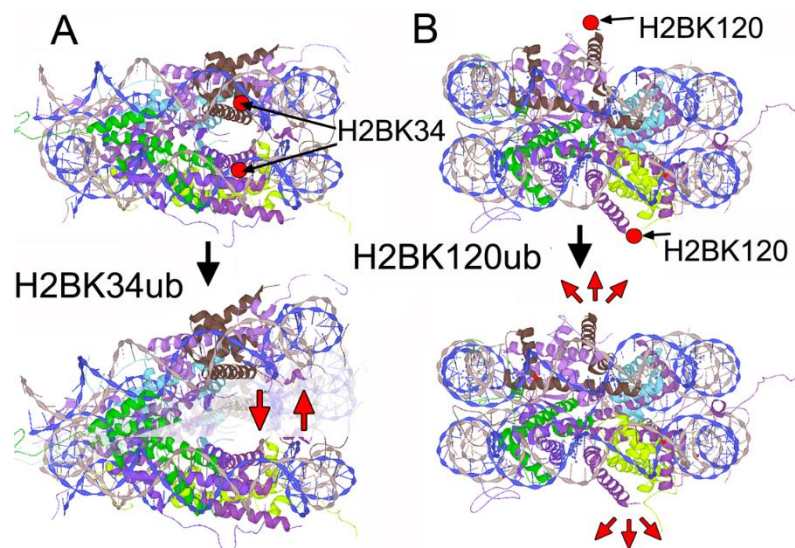


Рисунок 4.3 – Потенциальные структурные эффекты, вызванные ПТМ гистонов. А - ПТМ ядра нуклеосомы действует как «клин», «раскрывая» нуклеосому
В - ПТМ на концах гистонов дестабилизирует ассоциацию димера H2A-H2B за счет стохастических движений большой молекулы убиквитина и стерических столкновений с поверхностью нуклеосомы. Это способствует дыханию нуклеосом и раскрытию димеров ДНК [1-2].

4.2 Материалы и методы

В работе использовался комплекс стандартных биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов, такие как реконструкция нуклеосом из рекомбинантных гистонов и ДНК, содержащей последовательности ДНК с повышенной афинностью к октамеру гистонов, оценка структуры нуклеосом с помощью гидролиза микрококковой нуклеазой, а также посредством изучения профиля миграции образцов нуклеосом в полиакриламидных гелях и другие методы. Для реконструкции модифицированных нуклеосом использовались рекомбинантные гистоны *Xenopus laevis* и «химически» синтезированные аналоги модифицированных гистонов H2BK34ub и H2BK120ub. Для оценки стабильности реконструированных нуклеосом использовался метод «конкуренции» нуклеосом с избытком специфических и неспецифических акцепторов гистонов (свободная ДНК, переносчик гистонов Nap1) как мы описали это ранее [10-11].

Для регистрации FRET (Fluorescence Energy Transfer), убиквитилированные нуклеосомы, меченные FRET, иммобилизовали при покрытии ~ 10 нуклеосом/(10 мкм²) на предметном стекле кварцевого микроскопа посредством конъюгации стрептавидин-биотин. Наши нуклеосомы имеют линкер размером ≥ 20 п.н. на одном конце ДНК, который конъюгирован с биотином. Столик с пьезоэлектрическим приводом сканирует площадь 10 мкм², обнаруживая фотоны флуоресценции. После идентификации нуклеосом этап

перемещается, чтобы сфокусироваться на нуклеосоме, и детекторы собирают время прибытия фотонов с временным разрешением 10 нс до тех пор, пока флуорофоры фотообесцвечиваются. Мощность возбуждения флуоресценции регулируется для получения типичной скорости испускания (или детектирования) фотонов 30 ~ 50 кГц при объединении донора и акцептора. Мы использовали систему поглотителя кислорода и триплетный гаситель (0,02 ед. / мкл PCD, 1 mM PCA и 1 mM Trolox) для улучшения характеристик флуорофора. Собранные времена прихода фотонов подвергали анализу «максимального правдоподобия» (maximum-likelihood analysis, MLA) и временной корреляции второго порядка. Оценка MLA дает очень точные значения эффективности FRET для открытого и закрытого состояний. В сочетании с результатами корреляции флуоресценции, анализ приводит к кинетическим константам скорости движений. Практический предел пространственно-временного разрешения составляет 3 ~ 4 Å и несколько десятков мксек.

4.3 Результаты и обсуждение

Для регистрации внутренних динамических флуктуаций убиквитилированных нуклеосом использовали микроскопию FRET. Этот хорошо изученный метод позволяет оценивать расстояние между двумя интересующими участками нуклеосомы, на которых размещаются флуоресцентные метки Cy3 (донор) и Cy5 (акцептор) с разной длиной волны флуоресценции. Флуоресценция FRET донора под воздействием лазерного излучения (532 nm) частично поглощается и переизлучается FRET акцептором уже на длине волны излучения акцептора. Ясно, что флуоресценцию FRET акцептора определяет насколько эффективно акцептор может поглощать излучение FRET-донора, т.е. от физического расстояния между FRET донором и акцептором. Положения флуоресцентных меток выбраны так, что Cy3 и Cy5 оказываются в соседних витках ДНК на гистоновом коре на расстоянии, обеспечивающем эффективный FRET, Cy3 и Cy5 расположены на расстоянии -43/+38 нуклеотидов от центра нуклеосомы (“nucleosome dyad region”). Регистрируя изменения величины эффекта FRET можно изучать структурные изменения, происходящие в нуклеосоме, и их динамику в пределах разрешения регистрирующего устройства. Так, например, возможно оценить динамику димера гистонов при пространственно-временном разрешении суб-нм и суб-миллисекунды. Из-за массивности убиквитина структурные флуктуации убиквитилированных нуклеосом происходят в более медленном временном масштабе, что позволяет их регистрацию.

Для наглядности, результаты и комментарии к ним суммированы на рисунке 4.4.

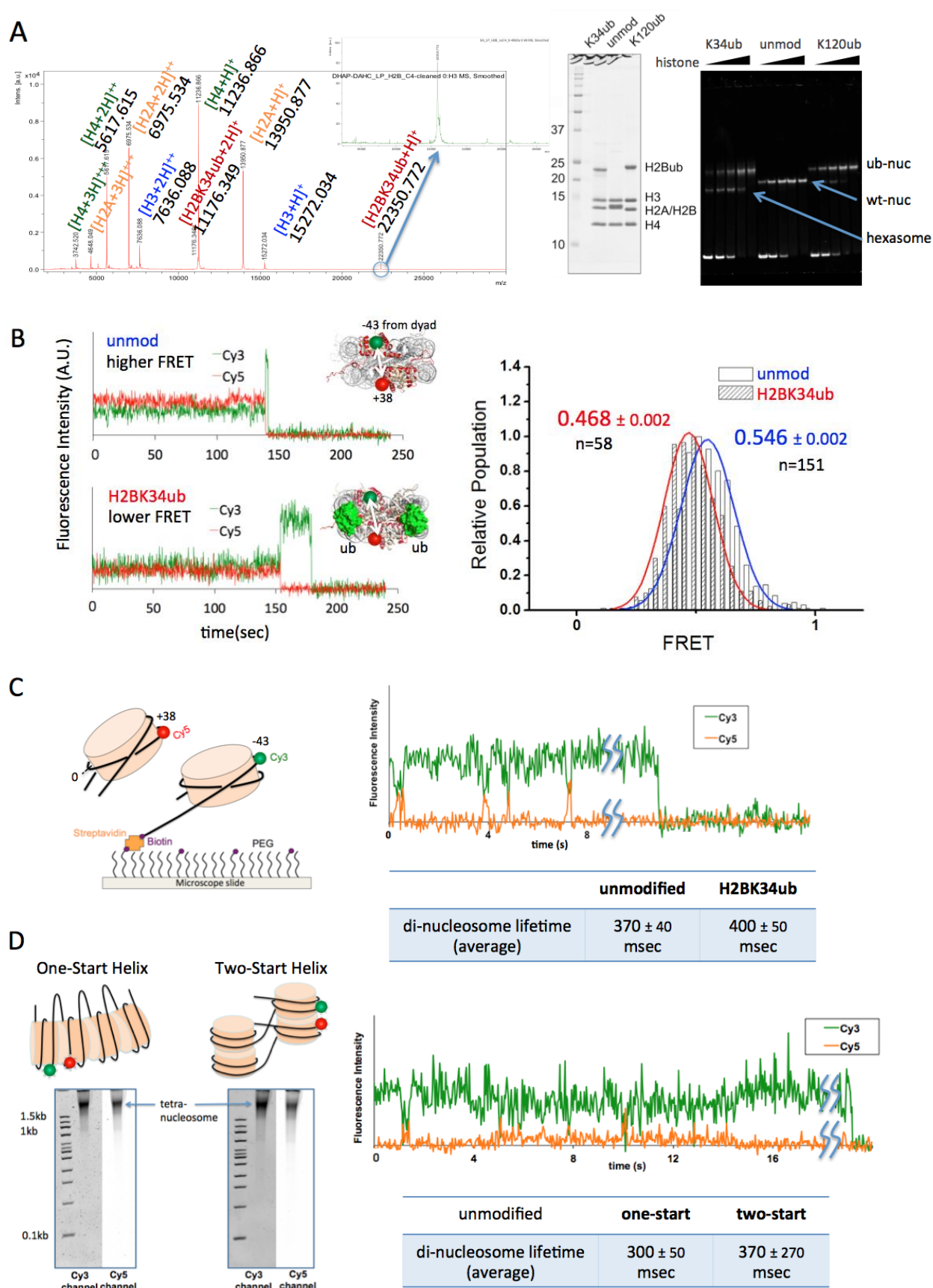


Рисунок 4.4 - Предварительные данные по убиквитилированному гистону H2Bub

A - MALDI-TOF mass-spectrum ясно демонстрирует высокую чистоту октамера гистонов, содержащего H2BK34ub. Никаких других пиков, кроме пиков гистонов, не наблюдается. Обратите внимание, что более тяжелые гистоны имеют меньшие пики из-за изначально

низкой эффективности ионизации тяжелых белков в MALDI. Сборка гистонового октамера (SDS-PAGE) и восстановление нуклеосом (Native PAGE) также были проанализированы, чтобы сделать вывод о высокой чистоте образцов. В - Предварительные данные FRET для одной молекулы, полученные из немодифицированных нуклеосом и нуклеосом H2BK34ub (положения FRET, Cy3-Cy5, помеченные соответственно на -43 и +38 нуклеотидах от центра нуклеосомы), ясно демонстрирующие более широкий промежуток между круговыми движениями H2BK34ub, решительно подтверждающий основную гипотезу о структурном возмущении, вызванном H2BK34ub. С - Формирование стека динуклеосом и диссоциация между двумя нуклеосомами в растворе показывают время жизни <500 мс и отсутствие влияния H2BK34ub, подтверждая, что межнуклеосомные взаимодействия в транскрипционно активных генах не будут оказывать значительного влияния на динамику Pol II. D - Даже между нуклеосомами, соединенными в формате массива (линкеры 30 п.н.), время жизни стека динуклеосом так же коротко, как показано на С, что еще больше подтверждает наш вывод о H2BK34ub

В согласии с нашей гипотезой [1, 4], добавление остатка убиквитина к остатку лизина K34 гистона H2B нуклеосом приводила к существенному увеличению т.н. “gapping” флуктуаций нуклеосомы (т.е. спонтанному «шарнирному» («hinge-like») раскрыванию витков нуклеосомной ДНК в направлении перпендикулярном плоскости нуклеосомы (см. рисунок 4.3 А)) с интервалом в сотни миллисекунд (Рисунок 4.4 В). При этом не наблюдалось сколько-нибудь значимого изменения стеккинг-взаимодействий между двумя нуклеосомами (рисунок 4.4 С, D).

4.4 Заключение

Нами впервые прямо показано, с использование FRET спектроскопии индивидуальных нуклеосом, что H2BK34ub оказывает значительное влияние на структурные флуктуации нуклеосом. Таким образом, модификации гистонов способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК и динамику нуклеосом, приводя к образованию функционально-активных структур хроматина. Предлагаемая нами концепция эпигенетического «структурного кода» активности хроматина более детально рассмотрена в работе, опубликованной нами ранее [1].

4.5 Список использованных источников

1. Krajewski W.A. "Direct" and "Indirect" Effects of Histone Modifications: Modulation of Sterical Bulk as a Novel Source of Functionality // *Bioessays* - 2020. - V. 42, P. e1900136.
2. Krajewski W.A. The intrinsic stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes and their in vitro assembly/disassembly by histone chaperone NAP1 // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* - 2020. - V. 1864, P. 129497.

3. Orlandi K., McKnight J. Bulky Histone Modifications May Have an Oversized Role in Nucleosome Dynamics // Bioessays - 2019 e1900217.
4. Krajewski W.A. Ubiquitylation: How Nucleosomes Use Histones to Evict Histones // Trends Cell Biol - 2019. - V. 29. - P. 689-694.
5. Mirabella A.C., Foster B.M., Bartke T. Chromatin deregulation in disease // Chromosoma - 2016. - V. 125. - P. 75-93.
6. Rezvykh A.P., Funikov S.Y., Protsenko L.A., **Kulikova D.A.**, Zelentsova E.S., Chuvakova L.N., Blumenstiel J.P., Evgen'ev M.B. Evolutionary dynamics of the pericentromeric heterochromatin in *Drosophila virilis* and related species // Genes. 2021. V. 12(2). P. 175. - **отчётная публикация Q2.**
7. Krajewski W.A., Luchnik A.N. High rotational mobility of DNA in animal cells and its modulation by histone acetylation // Mol. Gen. Genet. - 1991. - V. 231. - P. 17-21.
8. Singh J., Padgett R.A. Rates of in situ transcription and splicing in large human genes // Nat. Struct. Mol. Biol. - 2009. - V. 16. - P. 1128-1133.
9. Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications // Nature - 2000. - V. 403. - P. 41-45.
10. Krajewski W.A., Li J., Dou Y. Effects of histone H2B ubiquitylation on the nucleosome structure and dynamics // Nucleic Acids Res. - 2018. - V. 46. - P. 7631-7642.
11. Krajewski W.A. Effects of DNA superhelical stress on stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes // J. Mol. Biol. - 2018. - V. 430. - P. 5002-5014.

РАЗДЕЛ 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И МИОБЛАСТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ МЫШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

5.1 Введение

Лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия (ЛПЛМД или FSHD) - это аутосомно-доминантное заболевание с общей частотой встречаемости в Европе 1:8 000-20 000. ЛПЛМД связана с aberrантной экспрессией гена *DUX4*, кодирующего транскрипционный фактор, участвующий в раннем эмбриогенезе [1]. Во взрослых тканях *DUX4* репрессирован, и считается, что его aberrантная экспрессия в скелетных мышцах взрослых вызывает дисфункцию мышц через ряд факторов, включая окислительный стресс, повреждение ДНК и ингибирование миогенеза.

ЛПЛМД характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью, сопровождаемой замещением мышц жиром и коллагеном. В мышцах мышей с низким уровнем экспрессии *DUX4* наблюдаются избыток фибро-адипогенных предшественников, воспаление и фиброз. Иммуногистохимические исследования и магнитно-резонансная томография (МРТ) указывают, что при ЛПЛМД происходит воспалительный процесс с инвазией лимфоцитов в пораженные мышцы, а воспалительные условия при ЛПЛМД потенциально способствуют замещению мышечной ткани.

Ранее мы показали, что транзиторная экспрессия *DUX4* в миобластах человека повышает экспрессию хемокина CXCL12 (C-X-C motif ligand 12) и его рецептора CXCR4 (C-X-C motif Receptor 4) и индуцирует миграцию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к миобластам, экспрессирующим *DUX4*. МСК могут дифференцироваться в адипоциты и фибробласты и вносят основной вклад в развитие фиброза в различных тканях. Таким образом, аномальная миграция и накопление МСК в пораженных мышцах может привести к фиброзу, а не к восстановлению поврежденных мышечных волокон. Этот процесс может стимулироваться воспалением, характерным для мышц больных ЛПЛМД.

В 2021 году мы изучили взаимодействие между миобластами и МСК в модели ЛПЛМД *in vitro*. Мы показали, что миобласты больных ЛПЛМД привлекают МСК через сигнальную ось CXCL12-CXCR4 и стимулируют пролиферацию МСК. В условиях воспаления МСК, кондиционированные миобластами больных ЛПЛМД, увеличивают секрецию коллагена, а присутствие МСК в культуре миобластов нарушает формирование ими миотубул.

5.2 Материал и методы

5.2.1 Культуры клеток

Иммортиализованные миобласты (ИМ) здоровых доноров и доноров с ЛПЛМД были получены из Института миологии, Париж. Первичные миобласты (ПМ), выделенные из биопсий скелетных мышц здоровых доноров и доноров с ЛПЛМД, были любезно предоставлены Далилой Лаудж-Шенивесс. Человеческие МСК из жировой ткани были получены из коллекции клеточных культур ИБР РАН.

Миобласты культивировали в среде, состоящей из четырех частей высокоглюкозной DMEM (Paneco) и одной части среды 199 (Paneco), дополненной 15% FBS (HyClone), 1X Глутамакс (Gibco), 1X Пенициллин-Стрептомицин (Gibco), 10 мг/л человеческого рекомбинантного bFGF (Gibco) и 0,1 мкМ дексаметазона (Sigma). МСК культивировали в среде DMEM/F12 (Paneco), дополненной 10% FBS, 1X Глутамакс, 1X Пенициллин-Стрептомицин и 1X ITS (Gibco). МСК пассировали с использованием 0,05% трипсина-ЭДТА (Gibco) при 90% монослое, миобласты пассировали при конфлюентности клеток не более 50%, чтобы избежать клеточного старения и спонтанной дифференцировки.

5.2.2 Миогенная дифференцировка

Миобласты высевали в высокой плотности (100% монослой). Через 24 часа ростовую среду заменяли на среду для индукции миогенеза: высокоглюкозная среда DMEM, 2% лошадиная сыворотка (Paneco), 1X Glutamax, 1X пенициллин-streptomycin. При моделировании воспалительных условий 20 нг/мл TNF α (Sigma) добавляли на первый или четвертый день дифференцировки. Во время дифференцировки среду не меняли. На 5-й день дифференцировки миобласты или ко-культуры окрашивали красителем Гимзы-Мей-Грюнвальд. Вкратце, клетки промывали PBS (Paneco), фиксировали 100% этанолом при + 4°C в течение 5-10 минут и высушивали на воздухе. Затем клетки инкубировали в растворе Мей-Грюнвальд (эозин-метиленовый синий) (разведение 1:3 в 1 mM PBS pH 5,6) в течение 20 минут и растворе Гимзы (разведение 1:20 в 1 mM PBS pH 5, 6) в течение 40 минут и промывали дистиллированной водой. Образцы изучали с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX51 с камерой Olympus DP70. Для каждого образца фотографировали не менее 10 полей зрения и анализировали изображения в программе ImageJ. Оценивали диаметр миотубул и индекс слияния (FI). FI определялся как количество ядер внутри миотубул, деленное на общее количество ядер * 100%.

5.2.3 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки промывали PBS, фиксировали 4% PFA в течение 5-10 мин при + 4°C и инкубировали в блокирующем растворе (0,1% тритон X-100 (Sigma-Aldrich), 4% FBS, разведенный в PBS) в течение 30 мин. Первичные антитела, разведенные в блокирующем

растворе, наносили на ночь при +4°C во влажной камере. Затем клетки промывали PBS и наносили вторичные антитела (разведенные в блокирующем растворе в соотношении 1:1000) на 1 ч при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma) или PI (Biotium). Образцы изучали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX73, оснащенного камерой Olympus DP. Для каждого образца снимали не менее 10 полей зрения, изображения анализировали в программе ImageJ. Оценивали FI (описано выше) и процент миогенин-положительных ядер.

5.2.4 Проточная цитометрия

Клетки отделяли с помощью 0,05% трипсина-ЭДТА, промывали в PBS (CF 10 мин 300g), фиксировали с помощью Cytofix (BD Biosciences) в течение 20 мин при + 4°C и снова промывали. Затем клетки ресуспендировали в растворе первичных антител (анти-Ki-67 или анти-CXCL12) и инкубировали в течение ночи при + 4°C. Затем клетки промывали PBS, ресуспендировали в растворе вторичных антител (разведенных в блокирующем растворе в соотношении 1: 1000) и инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. После окрашивания образцы промывали PBS и анализировали на проточном цитометре Attune NxT. Для контроля неспецифического связывания вторичных антител анализировали также образцы, неокрашенные первичными антителами.

5.2.5 Анализ миграции клеток

Миграцию МСК в реальном времени исследовали с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence DP, используя пластину CIM для миграции. Анализ проводился в течение 25 часов, и измерения индекса клеток в реальном времени непрерывно регистрировались. Cell Index - это параметр без единицы измерения, который отражает изменения сопротивления, происходящие по мере того, как клетки мигрируют через мембрану из верхней камеры в нижнюю и прилипают к электронным датчикам на нижней стороне мембраны. Увеличение Cell Index коррелирует с увеличением числа мигрировавших клеток. Для каждой лунки рассчитывался delta Cell Index - индекс клеток в данной временной точке плюс значение дельта. Дельта-значение является постоянной величиной для каждой лунки и представляет собой разницу между эталонным значением дельта-индекса клеток и индексом клеток в дельта-временной точке.

Дополнительные анализы миграции проводили в 24-луночной системе Transwell (Corning), оснащенной пористыми поликарбонатными мембранами (диаметр 8 мкм). МСК высевали во вставки Transwell (104 клетки) и вставляли в нижнюю камеру системы через 6 ч после посева в верхнюю камеру. В нижнюю камеру помещали среду, кондиционированную миообластами, среду для миобластов, содержащую 2% FBS, или обычную среду с 10% FBS (положительный контроль). Систему выдерживали при 5% CO₂

в течение 24 ч, затем клетки промывали PBS и фиксировали 4% PFA. Клетки с внутренней поверхности мембраны удаляли ватными палочками. Затем мембрану вырезали, клетки на нижней стороне мембраны окрашивали DAPI (Sigma) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа KEYENCE BZ-9000 (BIOREVO). Подсчет ядер проводили не менее чем в пяти полях зрения.

Для анализа механизма миграции МСК среду, кондиционированную нормальными миобластами или миобластами больных ЛПЛМД, предварительно инкубировали с 10 нг/мл нейтрализующих антител против CXCL12 (Abcam) в течение 30 мин до анализа миграции. Обработка ингибитором CXCR4 AMD3100 (Sigma) проводилась в концентрации 10 мМ непосредственно во время анализа.

5.2.6 Статистический анализ

Данные представлены как среднее $\pm$ SD, р-значения следующие: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Для парных сравнений в зависимости от распределения данных использовался t-тест Стьюдента или непараметрический тест Манна-Уитни. Для множественных сравнений проводили тест Крускала-Уоллиса с поправкой FDR. Статистические данные рассчитывались в программе GraphPad Prism.

5.3 Результаты и обсуждение

Первичные и иммортализованные миобласты, взятые от пациентов с ЛПЛМД, имеют сходное с контрольными время удвоения, но демонстрируют дефекты миогенной дифференцировки. В первую очередь мы сравнили эффективность миогенной дифференцировки первичных (ПМ) и иммортализованных (ИМ) миобластов, использованных в данном исследовании. ИМ были получены от здорового человека (AB1190) и от пациента с ЛПЛМД (AB1080) и иммортализованы. ПМ были выделены из биопсий скелетных мышц здоровых людей и людей с ЛПЛМД. В соответствии с ранее опубликованными данными, ПМ и ИМ, полученные от пациентов с ЛПЛМД, имели дефекты миогенной дифференцировки: диаметр миотубул, образованных миобластами пациентов с ЛПЛМД, был в 1,5-2 раза меньше, чем диаметр миотубул, образованных контрольными миобластами (данные не показаны).

5.3.1. Миобласты, полученные от больных ЛПЛМД, стимулируют миграцию МСК через сигнальную ось CXCL12-CXCR4 и стимулируют их пролиферацию

Хемокиновая сигнальная ось CXCL12-CXCR4 участвует в воспалении и способствует миграции различных клеток, включая МСК. Аномальная миграция МСК может быть связана с фиброзом и замещением мышечной ткани жиром, что часто

наблюдается при ЛПЛМД. Ранее мы показали, что в экспрессирующих *DUX4* человеческих миобластах повышена экспрессия *CXCL12* и *CXCR4*, что приводит к усилению миграции МСК к этим клеткам. С помощью проточной цитометрии мы сравнили уровни белка *CXCL12* в контрольных ИМ и ИМ больных ЛПЛМД. Иммутизированные миобласты больных имели значительно более высокий уровень *CXCL12* (1913 ± 487 против 1206 ± 513 а.е. для миобластов больных и нормальных миобластов, соответственно, рисунок 5.1 А). Аналогичное повышение уровня *CXCL12* наблюдалось в мышечных биопсиях пациентов с ЛПЛМД, где *CXCL12* накапливался в интерстициальных областях (рисунок 5.1 В).

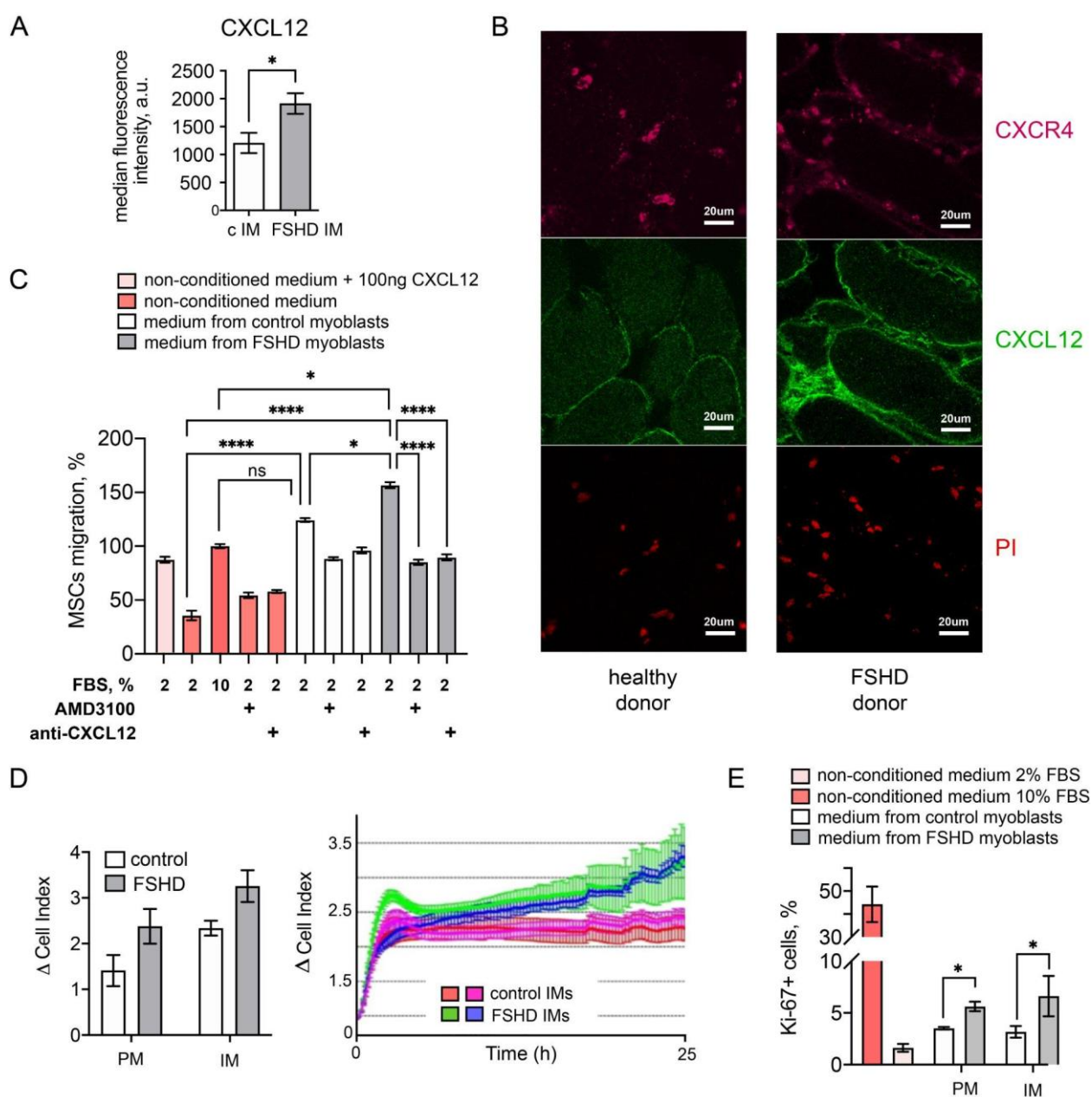


Рисунок 5.1 - *CXCL12*, секретируемый иммортализованными миобластами, стимулирует миграцию и пролиферацию МСК

(А) - уровень белка CXCL12 в миобластах, определенный методом FACS (среднее $\pm$ SD, * $p < 0,05$, $n = 7$); (В) - иммуногистохимическое окрашивание мышечной биопсии пациента с ЛПЛМД и биопсии здорового донора на CXCR4 (пурпурный) и CXCL12 (зеленый); ядра окрашены PI (красный). (С) - миграция МСК по направлению к среде, кондиционированной миобластами, при дополнительном воздействии ингибирующих факторов. Значения дельта-индекса клеток на 23 час эксперимента (слева) и динамические значения дельта-индекса клеток (справа) (среднее $\pm$ SD, * $p < 0,05$, $n = 5$) (Е) Пролиферация МСК в кондиционированной и некондиционированной средах, оцениваемая по проценту Ki-67-позитивных ядер. Данные проточной цитометрии (среднее $\pm$ SD, * $p < 0,05$, $n = 3$); IM - иммортализованные миобласты, PM - первичные миобласты; IM - иммортализованные миобласты, PM - первичные миобласты.

МСК привлекаются CXCL12 для миграции к очагу воспаления. Мы проанализировали, могут ли миобласты больных ЛПЛМД привлекать МСК посредством сигнальной оси CXCL12-CXCR4. Для этого мы измерили подвижность МСК в реальном времени в средах, кондиционированных контрольными миобластами и миобластами больных ЛПЛМД. Среда, кондиционированная ПМ и ИМ пациентов с ЛПЛМД, стимулировала миграцию МСК в 1,4 и 1,7 раза сильнее по сравнению со средой, кондиционированной контрольными миобластами ($3,3 \pm 0,3$ против $2,3 \pm 0,2$ для ИМ и $2,4 \pm 0,4$ против $1,4 \pm 0,3$ для ПМ) (рисунок 5.1 D). Чтобы подтвердить, что усиление миграции МСК связано с увеличением концентрации CXCL12 в кондиционированной миобластами среде, мы использовали нейтрализующие антитела против CXCL12 и AMD3100 - синтетический антагонист рецептора CXCL12, CXCR4. Предварительная инкубация кондиционированных сред с нейтрализующими антителами против CXCL12 или обработка МСК препаратом AMD3100 снизила миграцию МСК до контрольного уровня (рисунок 5.1 C)

Мы также изучили влияние факторов, секретируемых миобластами здоровых людей и людей с ЛПЛМД, на пролиферацию МСК. МСК были подвергнуты сывороточному голоданию в течение 48 часов, а затем перенесены либо в среду, кондиционированную миобластами, либо в среду, содержащую 10% FBS (положительный контроль). Через 24 часа после смены среды количество пролиферирующих Ki-67-позитивных клеток анализировали методом проточной цитометрии. Количество Ki-67-позитивных МСК было в $\sim 1,5$ раза выше в образцах, подверженных воздействию кондиционированной среды от миобластов больных ЛПЛМД по сравнению с образцами, подверженными воздействию кондиционированной средой от контрольных миобластов (рисунок 5.1 E). Таким образом, миобласты пациентов с ЛПЛМД усиливают миграцию МСК через CXCL12, а также их пролиферацию.

5.3.2. Миобласты больных ЛПЛМД стимулируют синтез и секрецию коллагена в МСК в условиях воспаления

МСК могут вырабатывать и секретировать коллаген, тем самым участвуя в накоплении компонентов внеклеточного матрикса и в фиброзе - процессе замещения мышечной ткани соединительной тканью. Повышенная секреция коллагена МСК в контексте ЛПЛМД может способствовать развитию фиброза.

Мы оценили синтез и секрецию коллагена в контрольных МСК и МСК, инкубированных в кондиционированной среде, отобранной из культур контрольных миобластов и миобластов с ЛПЛМД. Концентрация коллагена была измерена в клеточных лизатах и в среде после пяти дней инкубации. В стандартных условиях среда, кондиционированная миобластами, не повлияла ни на секрецию, ни на синтез коллагена (рисунок 5.2). МСК обычно привлекаются CXCL12 к очагу воспаления. Воспаление характерно для мышц больных ЛПЛМД, а также может способствовать постепенной атрофии скелетных мышц и фиброзу. Поэтому далее мы оценили синтез и секрецию коллагена в условиях воспаления, индуцированного TNF α . Количество коллагена в клеточных лизатах после обработки TNF α снизилось (рисунок 5.2 А), в то время как секреция коллагена в среду увеличилась (рисунок 5.2 В).

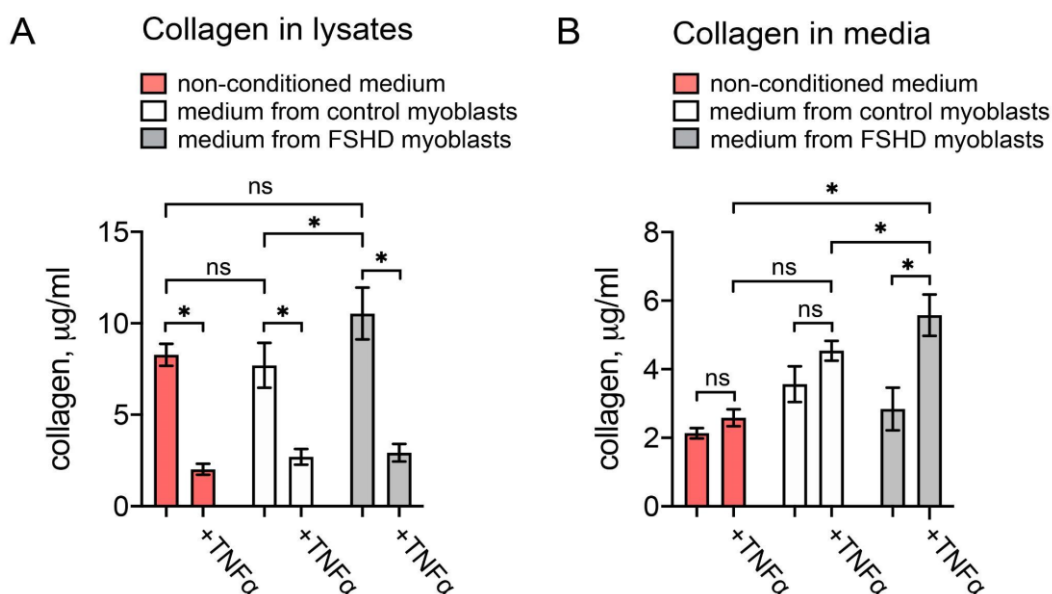


Рисунок 5.2 – Синтез и секреция коллагена МСК, культивируемыми в кондиционированных средах, в стандартных условиях и в условиях воспаления. Клетки культивировали в некондиционированной среде или в среде, кондиционированной миобластами (ЛПЛМД и контроль) в течение 5 дней, затем обрабатывали TNF α в течение 24 ч и измеряли концентрацию коллагена в лизатах МСК (А) и в среде (В); среднее $\pm$ SD, * $p < 0,05$, $n \geq 3$.

В МСК, кондиционированных средой от миобластов больных, секреция коллагена после обработки $TNF\alpha$ повысилась в большей степени (рисунок 5.2 В), что указывает на то, что в контексте ЛПЛМД миобласты могут стимулировать накопление коллагена за счет его секреции МСК и фиброз.

5.3.3. Присутствие МСК нарушает дифференцировку миобластов

Мы показали, что МСК мигрируют в пораженные мышцы и способствуют развитию фиброза, но их влияние на миобласты все еще не ясно. В присутствии миобластов МСК крыс способны дифференцироваться в миотубулы, поэтому, потенциально, человеческие МСК могли бы так же напрямую сливаться с миобластами и тем самым влиять на миогенез. МСК также могут влиять на миогенез опосредованно через секретируемые паракринные факторы.

Чтобы исследовать взаимное влияние МСК и миобластов друг на друга, мы культивировали здоровые ИМ и ИМ больных ЛПЛМД с МСК в различных соотношениях (1-50% МСК) и индуцировали миогенную дифференцировку после пяти дней совместного культивирования. Присутствие любого количества МСК снижало индекс слияния миобластов; этот эффект был более выражен в миобластах больных ЛПЛМД (рисунок 5.3 А).

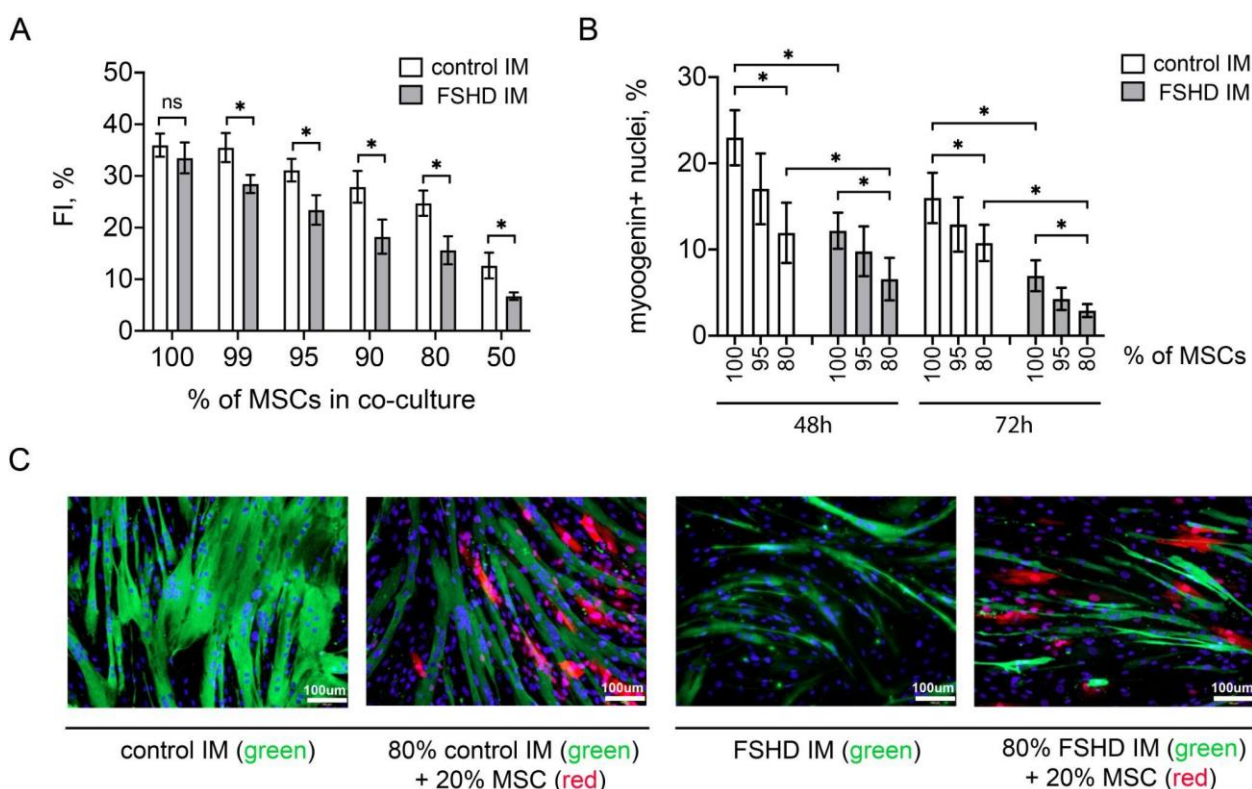


Рисунок 5.3 – Клетки HEK293 с индуцированными I-SceI транслокациями экспрессируют EGFP

Клетки HEK293 с плазмидами pEGFP-1ASce и pSce23, случайно интегрированными в различных хромосомных локациях. Трансформация клеток плазмидой, экспрессирующей

I-SceI, приводит к хромосомным транслокациям в некоторых клетках, и восстановлению экспрессии функционального белка EGFP. Контрольные клетки подвергались трансфекции плазмидой, экспрессирующей каталитически неактивный I-SceI.

Например, в совместной культуре с 10% МСК индекс слияния миобластов больных был снижен в 1,8 раза ($18,3 \pm 3,3$ против $32,5 \pm 3,0$), в то время как индекс слияния контрольных миобластов в тех же условиях был снижен только в 1,3 раза ($27,9 \pm 3,1$ против $36,0 \pm 2,2$). Процент ядер, экспрессирующих маркер миогенной дифференцировки миогенин, также снижался в присутствии МСК пропорционально их проценту в ко-культуре (рисунок 5.3 В).

Чтобы детектировать потенциальные гибридные миотубулы, возникающие в результате слияния миобластов с МСК, мы дифференциально окрасили МСК (красный; Turbo RFP) и миобласты (зеленый; MF20) и индуцировали миогенную дифференцировку в совместной культуре (рисунок 5.3 С). На пятый день дифференцировки в ко-культуре с 20% МСК гибридных миотубул обнаружено не было ни в одном из условий (миобласты больных ЛПЛМД или контрольные миобласты). Таким образом, присутствие МСК негативно влияет на миогенную дифференцировку и может способствовать мышечной дисфункции в контексте ЛПЛМД, но этот эффект не опосредован прямым слиянием МСК с миобластами в нашей системе.

5.4. Заключение и перспективы

Помимо миотубул и миогенных клеток-предшественников, скелетная мышца содержит популяцию фиброадипогенных предшественников/МСК. В физиологических условиях МСК участвуют в регенерации мышц, в то время как хроническое воспаление или постоянное повреждение мышц может побудить МСК к дифференцировке в адипоциты и способствовать фиброзу. МСК обнаруживаются во многих органах и тканях; их естественной нишей является периваскулярное пространство, откуда они могут мигрировать под воздействием специфических сигналов, включая сигналы оси CXCL12-CXCR4. Сигнальная ось CXCL12-CXCR4 контролирует органогенез, кроветворение, ангиогенез, нейрогенез, миграцию иммунных и первичных половых клеток, а также сохранение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в костном мозге. Дeregуляция CXCR4-CXCL12 связана с многочисленными патологическими состояниями, включая различные виды рака, хронические воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и иммунодефициты.

ЛПЛМД - это мышечное заболевание, связанное с aberrантной экспрессией гена *DUX4* [2]. Помимо прогрессирующей мышечной слабости и истощения, гистопатология

ЛПЛМД включает фиброз и замещение мышц жировой и соединительной тканями. Ранее мы показали, что миобласты, экспрессирующие *DUX4*, имеют повышенную экспрессию *CXCL12* и секретируют *CXCL12* как *in vivo*, так и *in vitro* (рисунок 5.2), что может привлекать МСК, экспрессирующие рецептор *CXCR4*, к мышцам больных. Действительно, МСК более активно мигрируют к миобластам, экспрессирующим *DUX4*, а в мышцах мышей со стохастическим низким уровнем экспрессии *DUX4* наблюдается заметное расширение фиброадипогенного прогениторного компартмента, что указывает на повышенное присутствие МСК. Какими могут быть функциональные последствия повышения количества МСК в мышцах больных?

В данной работе мы исследовали взаимное влияние МСК и миобластов друг на друга в модели совместного культивирования [3]. Мы показали, что среда, кондиционированная миобластами пациентов с ЛПЛМД, индуцирует миграцию МСК по *CXCL12*-зависимому механизму, а также стимулирует пролиферацию МСК. Среда, кондиционированная миобластами, увеличивала секрецию коллагена МСК, но только в условиях воспаления. Это согласуется с тем, что ранее наблюдалось как *in vivo* на мышинных моделях, так и у пациентов с ЛПЛМД. В мышинных моделях ЛПЛМД дегенерация мышц сопровождалась воспалением и увеличением отложения коллагена между пораженными миофибриллами. При МРТ-исследованиях в мышцах больных ЛПЛМД обнаруживается воспалительный процесс с инвазией лимфоцитов, а скорость замещения мышц жировой тканью выше в воспаленных мышцах больных ЛПЛМД по сравнению с не воспаленными. Примечательно, что *CXCL12*-*CXCR4* - это хемокиновая ось, которая может модулировать воспалительный ответ и сама подвергаться воздействию воспаления. Таким образом, при ЛПЛМД МСК могут мигрировать в воспаленные мышцы вследствие повышенной продукции *CXCL12* миобластами и способствовать развитию мышечного фиброза за счет повышенной секреции коллагена.

Мы также оценили влияние МСК на миогенез при совместном культивировании миобластов и МСК. Присутствие всего 5% МСК нарушало слияние миобластов, и этот эффект был более выражен для миобластов больных ЛПЛМД. Таким образом, присутствие МСК может нарушать миогенную дифференцировку и способствовать снижению регенерации мышц, которое наблюдается при ЛПЛМД.

Можно ли регулировать присутствие МСК в мышцах больных? Одним из возможных способов является воздействие на ось *CXCL12*-*CXCR4*. Действительно, мы показали, что обработка нейтрализующими антителами против *CXCL12* или AMD3100 снижает миграцию МСК до контрольного уровня. В будущем этот подход будет проверен на мышинных моделях ЛПЛМД.

5.5 Список использованных источников

1. Karpukhina A. and Vassetzky Y. DUX4, a Zygotic Genome Activator, Is Involved in Oncogenesis and Genetic Diseases // Russ. J. Dev. Biol. - 2020. - V.51. - P. 176–182.

2. **Karpukhina A.**, Tiukacheva E., Dib C., **Vassetzky Y.S.** Control of DUX4 expression in FSHD and cancer: from feedback loops to chromatin loops // Trends in Molecular Medicine. - 2021. - V.27. – P. 588-601. DOI: 10.1016/j.molmed.2021.03.008. **Q1 – отчетная публикация.**

3. **Karpukhina A.**, Galkin I., Ma Y., Dib C., Zinovkin R., Pletjushkina O., Chernyak B., Popova E., and **Vassetzky Y.S.** Analysis of genes regulated by DUX4 via oxidative stress reveals potential therapeutic targets for treatment of facioscapulohumeral dystrophy // Redox Biology. - 2021. - DOI: 10.1016/j.redox.2021.102008. – **Q1 – отчетная публикация.**

РАЗДЕЛ 6. ВЛИЯНИЕ ЯДЕРНОЙ АРХИТЕКТУРЫ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В РАЗНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК

6.1 Введение

Хромосомные aberrации часто приводят к онкологическим заболеваниям [1]. Молекулярно-генетические события на ранних стадиях рака до сих пор в значительной степени неизвестны, и в большинстве случаев отсутствуют надежные биомаркеры для раннего выявления заболевания [2]. Поскольку большинство онкологических заболеваний диагностируется на относительно продвинутой стадии, доступность ранних образцов раковой ткани для молекулярных анализов ограничена. Мы предложили разработать уникальную систему, которая будет не только имитировать связанные с раком хромосомные aberrации, такие как транслокация t(8;14) (лимфома Беркитта), делеция 3p21 (рак легких). Наша система также позволит выявить и выделить клетки, несущие хромосомные aberrации сразу после их появления. Последующий анализ таких клеток позволит исследовать ранние молекулярные механизмы, приводящие к раку.

6.2 Материал и методы

Работу проводили с использованием стандартных методов молекулярной и клеточной биологии.

Наш подход основан на восстановлении химерного гена EGFP, две части которого размещены в разных местах в одной хромосоме (для изучения делеций) или на двух разных хромосомах (для изучения транслокаций). Эти искусственные "экзоны EGFP" примыкают к модифицированному бета-глобиновому интрону, несущему сайт узнавания дрожжевой рестриктазы I-SceI (рисунок 6.1). После расщепления SceI и репарации ДНК при помощи NHEJ, химерный ген EGFP будет восстановлен, а белок EGFP будет экспрессироваться только в клетках с хромосомными aberrациями (рисунок 6.1 B).

6.3 Результаты и обсуждение

Нами был разработан метод индукции хромосомных транслокаций при помощи программируемых нуклеаз [3-5].

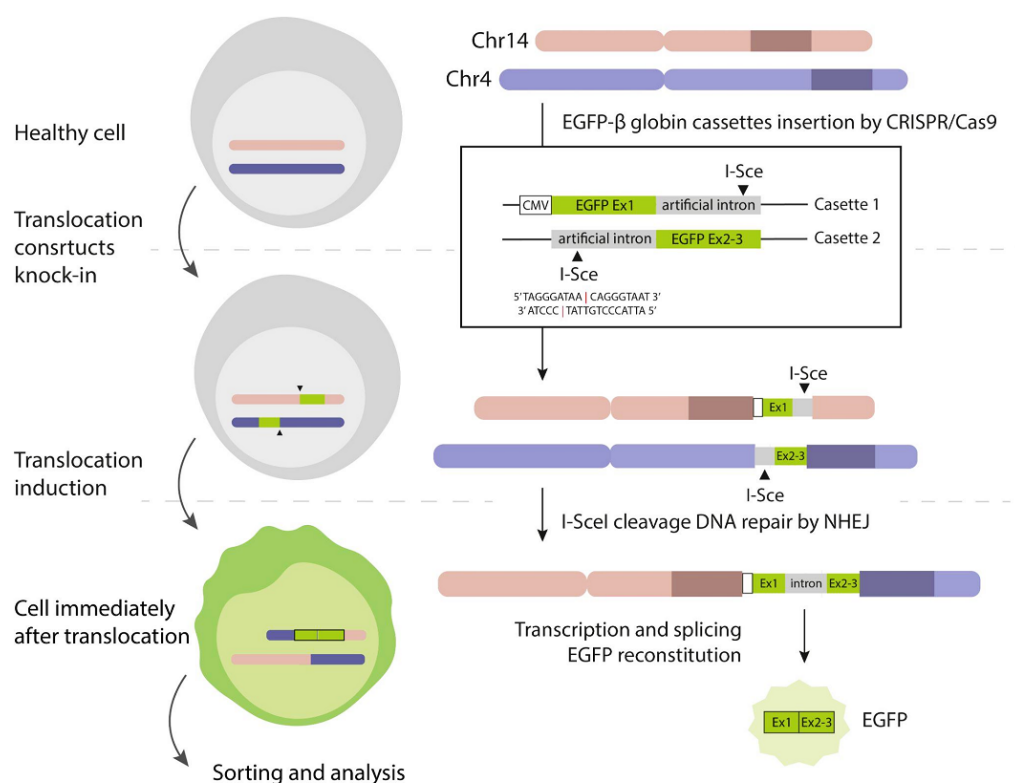


Рисунок 6.1 - Схема разработанной нами системы для раннего выявления хромосомных aberrаций. Состав кассет, которые используются для вставки в геном человека. Последовательность EGFP разделена на две части. 5'-EGFP-1, примыкающий к CMV-промотору, кодируется кассетами 1, а 3'-EGFP-2 - кассетами 2. Части EGFP на обеих кассетах соседствуют с универсальным искусственным интроном с сайтом распознавания I-SceI. Кассеты 1 и 2 будут вставлены в дистальную область гена IGH на хромосоме 14 и проксимальную область промотора гена MYC на хромосоме 8. Транслокация, вызванная эндонуклеазой I-SceI, воссоздает функциональный EGFP, который будет экспрессирован только в клетках, содержащих транслокацию.

В ходе этапа 2021 г. мы интегрировали кассеты для репортеров EGFP 1Asce, которая несет первый "экзон" гена EGFP под контролем CMV-промотора и интрона с сайтом узнавания I-SceI в локус 8q24 хромосомы 8, а вторую кассету Sce23, которая содержит тот же интрон с I-SceI и второй "экзон" EGFP, в локус 14q32 хромосомы 14 (рисунок 6.2) в лимфобластоидные клетки RPMI8866. Мы также направили интегрировали эти же кассеты во фланкирующие последовательности локуса 3p21.3 клеток культуры легочных фибробластов BEAS-2B для моделирования рака легкого.

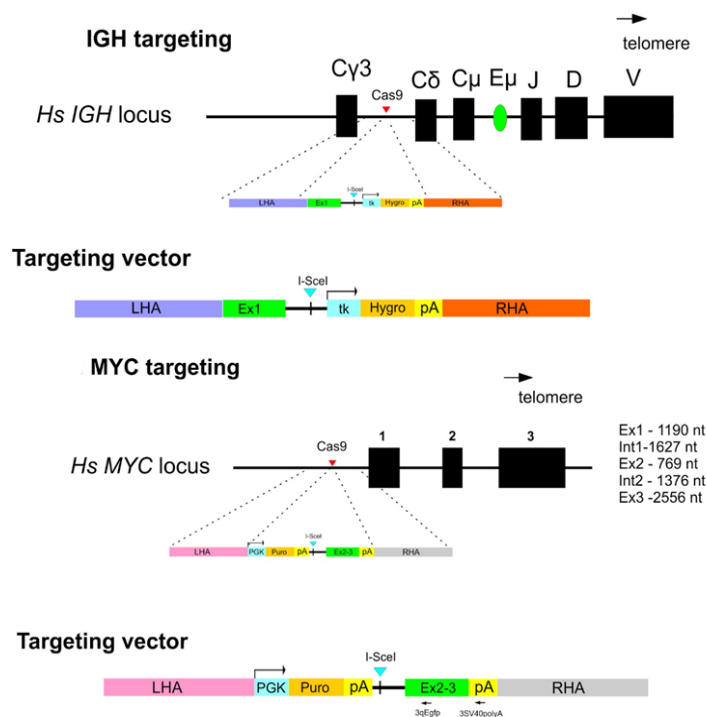
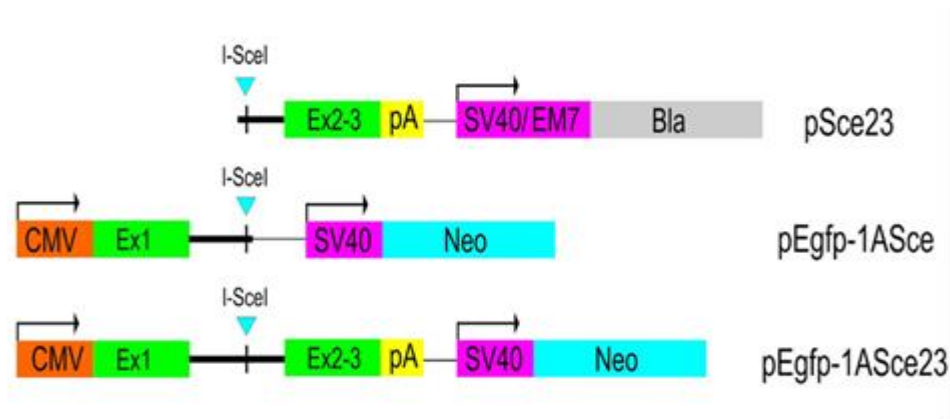


Рисунок 6.2 – Структура кассет и схема создания вектора для их интеграции в геном. Верхняя панель: Кассеты для раннего выявления хромосомных транслокаций. Промотор *CMV* обозначен оранжевым цветом, *EGFP* - зеленым цветом, сайт полиаденилирования - желтым цветом, промотор *SV40* - пурпурным цветом, гены бластоцидина и неомицина - серым и голубым цветом соответственно. Универсальный искусственный экзон обозначен жирной черной полосой.

Нижняя панель: Конструкция плазмиды для целевой установки кассет для генерации t(8;14) транслокации, типичной для эндемической лимфомы Беркитта. Кассеты для интеграции конструкций *EGFP* в локусы *IGH* на хромосоме 14 и *MYC* на хромосоме 8. Кассета для интеграции в locus *IGH* содержит экзон *Egfp* (зеленый цвет), за которым следуют искусственный экзон с сайтом I-SceI (жирная линия с голубым треугольником), ген гигромицина (темно-желтый цвет) под контролем промотора тирозинкиназы (*tk*) (синий цвет); сайт полиаденилирования (*pA*) отмечен желтым цветом. Левая гомологическая последовательность (*LHA* обозначена фиолетовым цветом, правая гомологическая последовательность (*RHA*) - оранжевым. В *MYC*-локусе планируется вставка второго экзона *Egfp*. Маркером селекции для кассеты *MYC* является пурамицин, который находится под контролем промотора *PGK*.

6.3.1 Экспериментальная проверка системы генерации хромосомных транслокаций при моделировании лимфомы Беркитта

После проверки правильной интеграции клеток в заданные регионы клеток RPMI8866, эти клетки были затем трансфецированы плазмидой, экспрессирующей I-Sce. Через 48 часов после экспрессии были детектированы зеленые клетки, экспрессирующие EGFP и свидетельствующие о возникновении хромосомной транслокации t(8;14) в части клеток (рисунок 6.3). При трансфекции стабильных клонов содержащих только одну кассету (1ASce или Sce23) плазмидой, экспрессирующей I-Sce, EGFP не детектировался, как и ожидалось. Частота хромосомных транслокаций в нашей системе составляет примерно 3×10^{-4} .

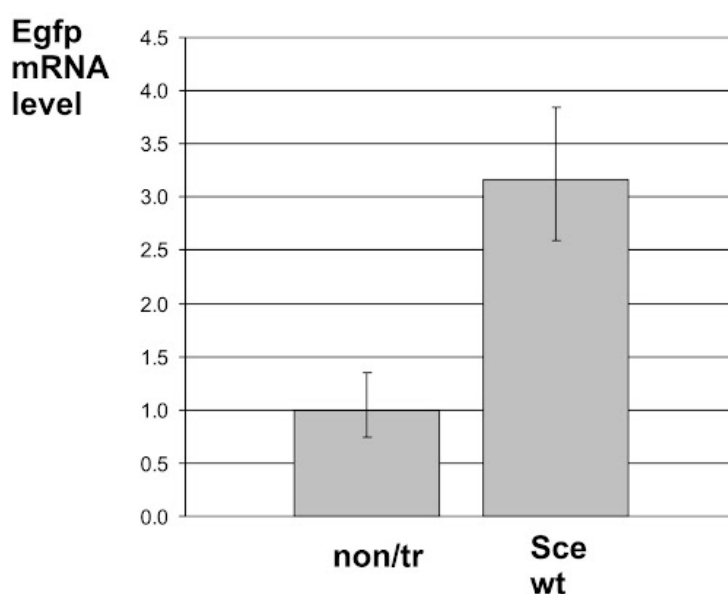


Рисунок 6.3 – Клетки RPMI8866 с индуцированной I-SceI транслокацией t(8;14) экспрессируют EGFP

Результаты qPCR анализа уровня транскрипта *Egfp* для эксперимента по трансфекции клеток RPMI8866 с плазмидами *pEGFP-1ASce* и *pSce23*, интегрированными в хромосомные локусы 8q24 и 14q32. Трансформация клеток плазмидой, экспрессирующей I-SceI, приводит к хромосомным транслокациям в некоторых клетках, и восстановлению экспрессии функционального белка EGFP.

6.3.2 Экспериментальная проверка системы генерации хромосомных транслокаций при моделировании рака легкого.

Для моделирования делеции del(3p21.3) специфичной для рака легкого нами были сконструированы плазмиды для целевой интеграции кассет 1ASce и pSce23 в регионы, фланкирующие локус 3p21.3 на хромосоме 3 (рисунок 6.4).

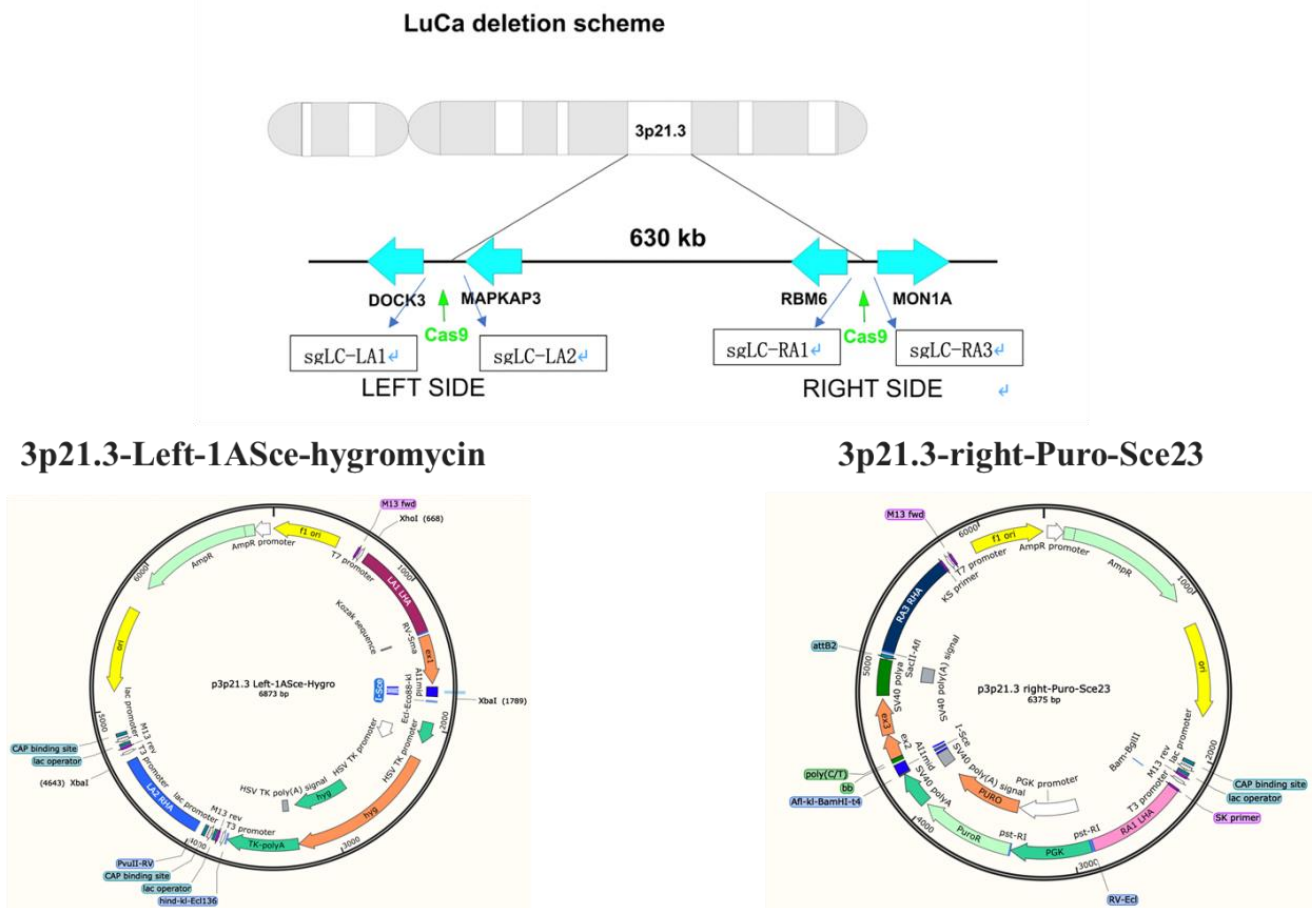


Рисунок 6.4 - Кассеты для интеграции конструкций EGFP в локус 3p21.3 на хромосоме 3. Кассеты для интеграции в проксимальный регион, фланкирующий локус 3p21.3 содержат экзон Egfr (зеленый цвет), за которым следуют искусственный экзон с сайтом I-SceI (жирная линия с голубым треугольником), ген гигромицина (темно-желтый цвет) под контролем промотора тирозинкиназы (tk) (синий цвет); сайт полиаденилирования (pA) отмечен желтым цветом. Левая гомологическая последовательность (LHA обозначена фиолетовым цветом, правая гомологическая последовательность (RHA) - оранжевым. В проксимальный регион, фланкирующий локус 3p21.3 был вставлен второй экзона Egfr. Маркером селекции для этой кассеты является пурамицин, который находится под контролем промотора PGK.

После проверки правильной интеграции кассет в заданные регионы клеток BEAS-2B, эти клетки были затем трансфицированы плазмидой, экспрессирующей I-Sce. Через 48 часов после экспрессии были детектированы зеленые клетки, экспрессирующие EGFP и свидетельствующие о возникновении делеции del(3p21.3) в части клеток (рисунок 6.5). При трансфекции стабильных клонов содержащих только одну кассету (1ASce или Sce23) плазмидой, экспрессирующей I-Sce, EGFP не детектировался, как и ожидалось. Частота хромосомных транслокаций в нашей системе составляет примерно 1×10^{-4} .

SceI-induced 3p21.3 region deletion in Beas-2B cells

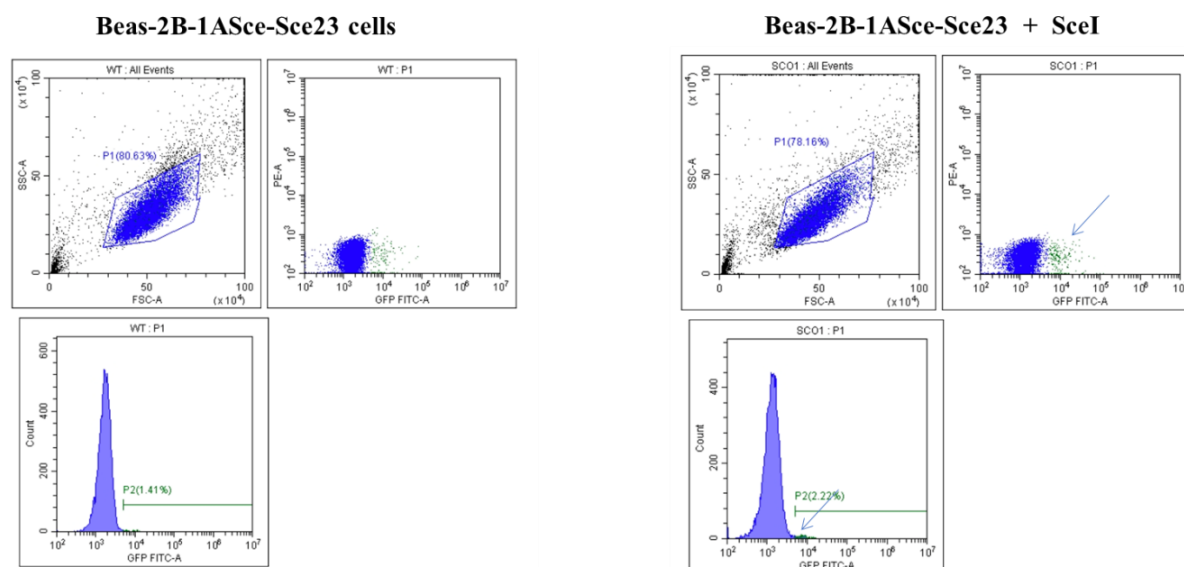


Рисунок 6.5 - Клетки BEAS-2B с индуцированной I-SceI делецией экспрессируют Egfr. Результаты сортировки клеток. Трансформация клеток плазмидой, экспрессирующей I-SceI, приводит к хромосомным транслокациям в некоторых клетках, и восстановлению экспрессии функционального белка EGFP. Левая панель, клетки не обработанные I-SceI (контроль). Правая панель, клетки, трансфицированные I-SceI. Стрелки показывают на увеличение синтеза Egfr после индукции I-SceI.

6.4 Заключение

В ходе этапа 2021 г. разработана система для направленной генерации хромосомных aberrаций при лимфоме Беркитта и раке легкого. Клетки с EGFP, несущие транслокации или делеции, будут проанализированы с использованием single-cell RNA-seq, HiC и ChIP для определения ранних эффектов хромосомных aberrаций на экспрессию генов и ядерную организацию. Наши данные также позволят выявить биомаркеры ранних стадий лимфомы Беркитта, рака легких и яичников. Далее мы проследим за их клональной эволюцией во время пассажей культивирования *in vivo* и *in vitro*, чтобы определить вторичные события, которые увеличивают онкогенный потенциал этих клеток. Знания о молекулярно-генетических событиях, связанных с ранними стадиями онкогенеза, полученные в результате этой работы, позволят разработать новые подходы для раннего выявления и лечения рака.

6.5 Список использованных источников

1. Ulianov S.V., Zakharova V.V., Galitsyna A.A., Kos P.I., Polovnikov K.E., Flyamer I.M., Mikhaleva E.A., Khrameeva E.E., Germini D., Logacheva M.D., Gavrilov A.A., Gorsky A.S., Nechaev S.K., Gelfand M.S., **Vassetzky Y.S.**, Chertovich A.V., Shevelyov Y.Y., Razin S.V.

Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes // Nature Communications. 2021. - V. 12. - Is. 1. Art. N 41. DOI: 10.1038/s41467-020-20292-z. **Q1 - отчетная публикация**

2. **Tikhomirova M.A.**, Sheval E.V. Formation of Biomolecular Condensates: Regulation of Embryogenesis at the Cellular Level // Rus. J. Dev. Biol. -. 2021. - V. 52. - P. 65–74. DOI: 10.1134/S1062360421020077. – **Q4 – Отчётная публикация**

3. Akbay B., Germini D., Bissenbaev A.K., **Musinova Y.R.**, Sheval E.V., **Vassetzky Y.**, Dokudovskaya S. Hiv-1 tat activates akt/mtorc1 pathway and aicda expression by downregulating its transcriptional inhibitors in b cells // IJMS. – 2021. – V. 22. – Is. 4. – P. 1-12. DOI: 10.3390/ijms22041588. –**Q1 – отчетная публикация**

4. Kurnaeva M.A., Zalevsky A.O., Arifulin E.A., Lisitsyna O.M., Tvorogova A.V., Shubina M.Y., Bourenkov G.P., **Tikhomirova M.A.**, Potashnikova D.M., Kachalova A.I., **Musinova Y.R.**, Golovin A.V., **Vassetzky Y.S.**, Sheval E.V. Molecular coevolution of nuclear and nucleolar localization signals inside the basic domain of HIV-1 // Tat. J. Virol. - 2021. - JVI0150521. doi: 10.1128/JVI.01505-21. – **Q1 – отчетная публикация**

5. **Karpova Y.**, Guo D., Makhov P., Haines A.M., Markov D.A., Kolenko V., Tulin A.V. Poly(ADP)-ribosylation inhibition: a promising approach for clear cell renal cell carcinoma therapy // Cancers. - 2021. - V. 13. - Is. 19 <<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/19/4973>> 10.3390/cancers13194973. – **Q1– отчетная публикация**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2021 году был поставлен ряд экспериментов с целью изучения механизмов генообразовательных процессов, а именно, механизма возникновения генов *de novo* внутри некодирующей ДНК. В последние годы стало ясно, что такой механизм формирования новых генов вполне реален. Исследование *de novo*-генов важно не только для понимания функционального и биологического вклада этих генов в видообразование. Они также несут информацию о направлении вектора эволюции генома, позволяя оценить адаптивные возможности вида. Ранее, мы обратили внимание на ген *D. melanogaster lawc*, который не является эволюционно консервативным и кодирует небольшой белок с неизвестными функциями. В результате биоинформационного анализа мы установили, что этот ген не имеет эволюционных предшественников за пределами группы видов *drosophila*, возник *de novo* примерно 30 млн лет назад и поддерживается отбором. Мы склоняемся в пользу гипотезы «transcription first», когда генообразовательным процессам предшествует активная транскрипция и формирование нкРНК. Дальнейшие исследования будут направлены на установление точной функции белка LAWС.

В 2021 году было продолжено исследование функций белка ТТН – продукта гена, родственного семейству нейрогенов *d4*. Были получены новые данные о том, что функции этого белка связаны с оптической системой и гормональной регуляцией развития дрозофилы. О высоком консерватизме белков этого семейства говорит факт того, что похожая изоформа у мыши экспрессируется в сетчатке глаза. Каким образом функционирует белок ТТН пока не ясно, однако, обнаруженный в его структуре сайт ядерной локализации и наличие самого ТТН в ядре позволяет заключить, что он необходим для ядерно-цитоплазматического транспорта и основные функции осуществляет в ядре клетки. Дальнейшие исследования на дрозофиле помогут разобраться в этом вопросе.

Ряд полученных в 2021 году результатов также связан с изучением эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов. Мы продолжили исследования особенностей открытой ранее в экспериментах на дрозофиле эпигенетической регуляции генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора (AHR) человека. На данном этапе исследования проводили на опухолевых клетках глиобластомы человека, используя ингибитор гистоновой деацетилазы, которая подавляет экспрессию генов на эпигенетическом уровне через модификацию гистонов. Мы показали, что этот ингибитор (белинонат) усиливает экспрессию гена *AHR* и двух его генов-мишеней в клетках глиобластомы, повышая эффективность действия лигандов AHR. Так как лиганды AHR и эпигенетические ингибиторы используются в противоопухолевой терапии разных видов рака, в том числе

глиобластом, результаты работы можно рекомендовать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний.

Упаковка хроматина зависит от структуры нуклеосом, в состав которых входят модифицированные гистоны. В 2021 г. нами впервые методом спектроскопии FRET индивидуальных нуклеосом прямо показано, что модификация гистона H2BK34ub оказывает значительное влияние на структурные флуктуации нуклеосом. Таким образом, модификации гистонов способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК и динамику нуклеосом, приводя к образованию функционально-активных структур хроматина. В результате была продемонстрирована наша концепция эпигенетического «структурного кода» активности хроматина.

Изучено взаимодействие мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и миобластов в патогенезе мышечного заболевания лице-плече-лопаточной мышечной дистрофии (ЛПЛМД), которое сопровождается фиброзом и замещением мышц жировой и соединительной тканями. Была установлена ранее неизвестная связь между увеличенной секрецией коллагена, вызванной миграцией МСК, и воспалением, сопровождаемым активацией хемокиновой оси CXCL12-CXCR4. Было показано, что при ЛПЛМД МСК могут мигрировать в воспаленные мышцы вследствие повышенной продукции CXCL12 миобластами и способствовать развитию мышечного фиброза за счет повышенной секреции коллагена. В будущем планируется применение нейтрализующих антител против CXCL12 или AMD3100 на мышинных моделях ЛПЛМД, чтобы подтвердить наши результаты *in vivo*.

Разработана система для направленной генерации хромосомных aberrаций при лимфоме Беркитта и раке легкого. Клетки с EGFP, несущие транслокации или делеции, в дальнейшем будут проанализированы с использованием single-cell RNA-seq, HiC и ChIP для определения ранних эффектов хромосомных aberrаций на экспрессию генов и ядерную организацию. Наши данные также позволят выявить биомаркеры ранних стадий лимфомы Беркитта, рака легких и яичников. Далее мы проследим за их клональной эволюцией во время пассажей культивирования *in vivo* и *in vitro*, чтобы определить вторичные события, которые увеличивают онкогенный потенциал этих клеток. Знания о молекулярно-генетических событиях, связанных с ранними стадиями онкогенеза, полученные в результате этой работы, позволят разработать новые подходы для раннего выявления и лечения рака.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

1. Akbay B., Germini D., Bissenbaev A.K., **Musinova Y.R.**, Sheval E.V., **Vassetzky Y.**, Dokudovskaya S. Hiv-1 tat activates akt/mTORC1 pathway and aicda expression by downregulating its transcriptional inhibitors in b cells//International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – Is. 4. – Art. no 1588. – P. 1-12. DOI: 10.3390/ijms22041588. – Q1
2. **Cherezov R.O.**, **Vorontsova Ju.E.**, **Simonova O.B.** The phenomenon of evolutionary “de novo generation” of genes // Rus. J. Dev. Biol. – 2021. - Vol. 52. - No. 6. - P. 395–405. DOI: 10.1134/S1062360421060035. - Q4
3. **Karpova Y.²**, Guo D., Makhov P., Haines A.M., Markov D.A., Kolenko V., Tulin A.V. Poly(ADP)-Ribosylation Inhibition: A Promising Approach for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Therapy//Cancers. 2021. Vol. 13. Is. 19. Art. No 4973. DOI: 10.3390/cancers13194973. – Q1.
4. **Karpukhina A.**, Galkin I., Ma Y., Dib C., Zinovkin R., Pletjushkina O., Chernyak B., Popova E, **Vassetzky Y.S.** Analysis of genes regulated by DUX4 via oxidative stress reveals potential therapeutic targets for treatment of facioscapulohumeral dystrophy // Redox Biology. 2021. Vol. 43. Art. No 102008. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102008 – Q1
5. **Karpukhina A.**, Tiukacheva E., Dib C., **Vassetzky Y.S.** Control of DUX4 expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy and cancer // Trends in Molecular Medicine. 2021. Vol. 27. Is. 6. P. 588-601. DOI: 10.1016/j.molmed.2021.03.008 – Q1.
6. Kurnaeva M.A., Zalevsky O., Arifulin E.A., Lisitsyna O.M, Tvorogova A.V., Shubina M.Y., Bourenkov G.P., **Tikhomirova M.A.**, Potashnikova D.M., Kachalova A.I., Musinova Y.R., Golovin A.V., Vassetzky Y.S., Sheval E.V. Molecular coevolution of nuclear and nucleolar localization signals inside the basic domain of HIV-1 Tat // J. Virol. - 2021. DOI: 10.1128/JVI.01505-21 - Q1
7. Rezvykh A.P., Funikov S.Y., Protsenko L.A., **Kulikova D.A.**, Zelentsova E.S., Chuvakova L.N., Blumenstiel J.P., Evgen'ev M.B. Evolutionary dynamics of the pericentromeric heterochromatin in Drosophila virilis and related species // Genes. - 2021. Vol. 12. Is. 2. P. 175. DOI: 10.3390/genes12020175 - Q2.
8. Stasevich E.M., Murashko M.M., **Zinevich L.S.**, Demin D.E., Schwartz A.M. The Role of NonCoding RNAs in the Regulation of the Proto-Oncogene MYC in Different Types of Cancer // Biomedicines. – 2021. - V. 9. - P. 921. DOI: 10.3390/biomedicines9080921. - Q1
9. **Тихомирова М.А.³**, Шеваль Е.В. Формирование биомолекулярных конденсатов: регуляция эмбриогенеза на клеточном уровне//Онтогенез. 2021. Т.52. № 2. С. 83–93. DOI: 10.31857/S0475145021020075. – R. – **Tikhomirova M.A.³**, Sheval E.V. Formation of Biomolecular Condensates: Regulation of Embryogenesis at the Cellular Level//Russian

Journal of Developmental Biology. 2021. Vol. 52. P. 65–74. DOI: [10.1134/S1062360421020077](https://doi.org/10.1134/S1062360421020077). – Q4

10. Ulianov S.V., Zakharova V.V., Galitsyna A.A., Kos P.I., Polovnikov K.E., Flyamer I.M., Mikhaleva E.A., Khrameeva E.E., Germini D., Logacheva M.D., Gavrilov A.A., Gorsky A.S., Nechaev S.K., Gelfand M.S., **Vassetzky Y.S.**, Chertovich A.V., Shevelyov Y.Y., Razin S.V. Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes // Nature Communications. - 2021. - V. 12. - Is. 1. Art. N 41. DOI: 10.1038/s41467-020-20292-z.– Q1.

11. Zatsepina O.G., Nikitina E.A., Shilova V.Y., Chuvakova L.N., **Sorokina S., Vorontsova J.E.**, Tokmacheva E.V., Funikov S.Y., Rezvykh A.P. & Evgen'ev M.B. Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster* // Cell Stress and Chaperones. 2021. - V. 26. Is. 3. – P. 575-594. DOI: 10.1007/s12192-021-01203-7. - Q3

Патент: Новый рекомбинантный аналог гормона роста пролонгированного действия. № патента 2753191 от 12.08.2021. Авторы: **Гасанов В.А. оглы**, Шевалье А.Ф., **Симонова О.Б.**, Мерцалов И.Б., Куликова Д.А

Отчет утвержден Ученым советом 28 декабря 2021 года Протокол № 14.