

На правах рукописи

Золотаренко Алена Дмитриевна

**РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FRA1 В ПАТОГЕНЕЗЕ
ПСОРИАЗА**

Специальность 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2015

Работа выполнена в лаборатории функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

БРУСКИН Сергей Александрович - заведующий лабораторией функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

ПАТРУШЕВ Лев Иванович - ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

кандидат биологических наук

СКОБЛОВ Михаил Юрьевич - ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико-генетический научный центр»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 2015 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8(499)135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Псориаз – многофакторное иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи, от которого страдают около 2% популяции в мире. Проявления псориаза варьируют по степени тяжести, при этом в легких формах на коже больных могут наблюдаться лишь несколько локальных повреждений, а при тяжелых формах заболевания (около 30% случаев) может быть поражена большая часть поверхности тела, что приводит к временной потере работоспособности или даже инвалидизации. Как правило, периоды обострения сменяются периодами ремиссии, при этом заболевание может усиливаться с годами, а также под воздействием провоцирующих факторов – стрессов, употребления лекарственных препаратов, алкоголя, курения и других. Псориаз приводит к значительному снижению уровня жизни людей, кроме того, сопровождается коморбидностями: псориатическим артритом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, метаболическими расстройствами, депрессией.

Патогенез заболевания связан с изменениями в иммунных профилях кожи больных, «цитокиновым штормом» в очагах поражения, избыточной инфильтрацией кожи иммунными клетками, а также гиперпролиферацией и нарушенной дифференцировкой кератиноцитов, разрастанием сосудистой сети в областях поражения. Все это приводит к появлению на коже характерных повреждений – псориатических бляшек, которые могут сопровождаться болевыми ощущениями и зудом.

На сегодняшний день точные молекулярно-генетические причины заболевания не установлены. Оно является неизлечимым, а существующие методы терапии позволяют лишь снизить проявления симптомов и увеличить периоды ремиссии.

Благодаря стремительному развитию геномных и постгеномных технологий, в последние годы появились новые подходы для масштабных исследований, позволяющие проводить их не на уровне отдельных генов или их групп, а на уровне всего генома. Такие исследования, вкупе с соответствующими наработками в области информационных технологий, позволяют составлять карты и сети коэкспрессирующихся генов и их взаимодействующих белковых продуктов, связанных с развитием заболевания. Выявление основных регуляторных узлов позволяет разрабатывать методы воздействия, направленные

на конкретные участки сигнальных каскадов, то есть действовать более точно и специализированно, не нарушая систему целиком.

Семейство AP-1 является важным регулятором пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, процессов воспаления и иммунного ответа. Функции членов семейства в коже разнообразны: они участвуют в дифференцировке эпидермиса, в процессах заживления ран, их активность может быть связана с онкогенной трансформацией. Роль отдельных членов семейства в патогенезе псориаза изучена слабо, однако имеющиеся данные позволяют предположить, что AP-1 может играть важную роль в развитии данной патологии.

Таким образом, принимая во внимание значительную распространенность заболевания, его до конца не выясненную этиологию, хроническое течение и отсутствие методов лечения, позволяющих полностью излечить заболевание, можно констатировать, что изучение молекулярно-генетической природы псориаза и идентификация ключевых регуляторных звеньев патогенеза являются весьма актуальными на сегодняшний день задачами. Решение данных задач позволит разработать новые, более эффективные подходы к терапии, а возможно, приведет к полному излечению заболевания.

Цель исследования:

Осуществить сравнительное полногеномное профилирование транскриптома пораженной и визуально непораженной кожи при псориазе, выявить основные сигнальные каскады, связанные с заболеванием, и оценить роль транскрипционного фактора FRA1 в их регуляции.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие **задачи** исследования:

- Провести сравнительное полногеномное профилирование транскриптома кожи больных псориазом при помощи высокопроизводительного секвенирования РНК.
- Идентифицировать измененные сигнальные каскады и их ключевые регуляторные звенья, связанные с развитием заболевания, и проанализировать роль членов семейства AP-1 в патогенезе псориаза.
- Создать конструкции и провести опыты по сверхэкспрессии и ингибированию *FRA1* в культуре клеток кожи человека.

- Идентифицировать гены-мишени транскрипционного фактора FRA1, которые могут играть роль в патогенезе псориаза, и оценить регуляторный потенциал FRA1 в контексте заболевания.

Научная новизна и значимость работы

Обогащенные дифференциально экспрессированными генами (ДЭГ) сигнальные каскады, идентифицированные в ходе сравнительного полногеномного профилирования кожи при псориазе, могут рассматриваться в качестве мишеней при разработке новых подходов к созданию высокоэффективных терапевтических препаратов для лечения псориаза, при разработке моделей заболевания, а также при оценке ответа больных на тот или иной тип лечения.

Проведенный автором анализ позволил выявить основные регуляторы транскрипции дифференциально экспрессированных генов, в том числе, идентифицировать 37 транскрипционных факторов, ранее не ассоциированных с псориазом.

Впервые выдвинута и экспериментально подтверждена гипотеза, объясняющая роль транскрипционного фактора FRA1 в патогенезе псориаза. Гипотеза проверена и подтверждена при помощи оценки накопления FRA1 в пораженной псориазом коже на уровне мРНК и белка, а также путем его сверхэкспрессии и ингибирования в культуре кератиноцитов человека.

Впервые идентифицированы мишени транскрипционной регуляции FRA1, связанные с патогенезом псориаза, и подтверждена роль изменений их экспрессии в развитии заболевания.

Все эти данные могут быть использованы для разработки подходов к созданию новых моделей псориаза, а также при создании новых терапевтических агентов.

Положения, выносимые на защиту:

- Наиболее обогащены ДЭГ при псориазе являются сигнальные каскады воспаления и активации иммунной системы.
- Впервые показаны ассоциации 37 транскрипционных факторов с псориазом.
- Семейство AP-1 и его компонент FRA1 являются одними из основных регуляторов сигнальных каскадов, обогащенных дифференциально экспрессированными при псориазе генами.

- *FRA1* гиперэкспрессирован в коже больных псориазом на уровне мРНК и белка.
- *FRA1* непосредственно регулирует экспрессию генов матриксных металлопротеаз *MMP1*, *MMP12* и циклина *CCNA2*, что говорит о его важной роли в качестве регулятора сигнальных каскадов ремоделирования внеклеточного матрикса и пролиферации клеток, измененных при псориазе.

Личный вклад автора

Автор принимала личное участие на всех этапах выполнения работы, а именно: в выделении РНК из биопсий и создании библиотек для проведения массивного параллельного секвенирования транскриптома; в биоинформационном анализе данных и построении карт генных взаимодействий, обогащенных ДЭГ (совместно с Mehta R., Артемовым А.В., под руководством Брускина С.А.); в оценке экспрессии членов семейства AP-1 при псориазе методом количественной ПЦР в реальном времени; в создании векторных конструкций и опытах по сверхэкспрессии *FRA1* в кератиноцитах человека; в отработке методики трансфекции кератиноцитов малыми интерферирующими РНК; в опытах по ингибированию *FRA1* в кератиноцитах человека; в приготовлении иммуногистохимических препаратов кожи и вестерн-блоттингу; в оценке экспрессии генов-мишеней *FRA1* при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Автор лично проводила статистическую обработку полученных результатов и оформляла результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимала участие в написании статей по результатам работы.

Апробация результатов работы

Результаты проведенных исследований были представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на 18 конгрессе Европейской Академии Дерматологии и Венерологии (EADV Congress, Berlin, 2009); на съезде Европейской Организации Молекулярных Биологов (EMBO, Barcelona, 2010); на 38-м конгрессе Федерации Европейского Биохимического Общества (36thFEBS Congress, Torino, 2011); на международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Минск, 2012; на конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань, 2012, 2014; на 44-м ежегодном съезде Европейского Общества по Дерматологии и Венерологии

(ESDR meeting, Copenhagen, 2014); на 2-м Саммите по Воспалительным Заболеваниям Кожы (ISDS summit, Vienna, 2014) и других. Диссертация апробирована на межлабораторном семинаре отдела генетических основ биотехнологий ИОГен РАН 17.12.2014 г.

Публикации

Автором опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на **139** страницах машинописного текста, включает **16** таблиц и **27** рисунков. Список цитируемых литературных источников включает **158** наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В настоящей работе были проанализированы 3 выборки пар биопсий больных псориазом, общий объем которых составил 37 пар (еще 5 пар биопсий были собраны и обработаны, но не прошли оценку по качеству РНК). На 14 парах биопсий больных псориазом (выборка 1) методом массивного параллельного секвенирования транскриптома были проанализированы профили экспрессии генов. Результаты секвенирования по технологии SOLID4 были обработаны при помощи пакета программ BioScore, картированы на референсный геном, экспрессия проанализирована при помощи пакета DESeq приложения Bioconductor. При обработке результатов полногеномного секвенирования применялись программная среда R (<http://www.r-project.org/>) и приложение Rstudio (<http://www.rstudio.com/>), пакеты Bioconductor и DESeq (<http://www.bioconductor.org/>), а также программное обеспечение MS Excel 2010 (Microsoft). Статистический анализ основывался на применении модели негативного биномиального распределения для оценки достоверности различий

между выборками, а также использовании поправки Бенджамини-Хохберга для снижения доли ложноположительных результатов. Достоверными считали различия в экспрессии генов между пораженной и непораженной кожей больше, чем в 1,5 раз, характеризовавшиеся $p\text{-value} < 0.05$ при попарном сравнении и $FDR < 0.05$. После получения списка дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) проводили дальнейший анализ с использованием баз данных и программных продуктов MetaCore, DAVID, KEGG, который позволил идентифицировать сигнальные пути и процессы, обогащенные ДЭГ, а также выявить их основные регуляторы.

Методом количественной ПЦР в реальном времени на 13 парах биопсий больных псориазом (выборка 2) были оценены изменения экспрессии 7 генов AP-1 (*JUN*, *JUNB*, *JUND*, *FOS*, *FOSB*, *FRA1* и *FRA2*), кроме того, для подтверждения изменений экспрессии *FRA1* была проанализирована дополнительная выборка из 10 пар биопсий больных псориазом (выборка 3). Для оценки относительных уровней экспрессии генов использовали метод сравнения пороговых уровней амплификации (2- $\Delta\Delta C_t$). Данные анализировали с применением непараметрических тестов (U-тест Манна-Уитни, тест Колмогорова-Смирнова). Для оценки накопления белка *FRA1* в коже применяли иммуногистохимическое окрашивание, опыты проводили на 5 парах биопсий больных псориазом из выборки 3.

Для получения клеток кожи человека, характеризующихся сверхэкспрессией *FRA1* в составе Tet-On системы, были созданы лентивирусные частицы, несущие конструкции, созданные автором на основе векторов FU-tet-o-hOct4, FUDeltaGW-rtTA (Addgene). Сборку и наработку лентивирусных частиц проводили в клетках линии HEK-293T при помощи трансфекции липидным агентом Metafectene Pro (Biontex). Клетки линии HaCaT параллельно заражали вирусными частицами, несущими конструкции FU-tet-o-hFRA1 и FUDeltaGW-rtTA-IRES-puro (вектор получен в Лаборатории генетических основ клеточных технологий И.В.Честковым), с последующим отбором клеток с интеграцией целевых вставок в геном на селективном антибиотике пурамицине и оценкой экспрессии при помощи количественной ПЦР в реальном времени.

Для ингибирования экспрессии *FRA1* были использованы малые интерферирующие РНК, последовательности которых были подобраны в приложении BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen). Была проведена отработка методик трансфекции кератиноцитов малыми интерферирующими РНК и

выбрана последовательность siRNA, которая позволила ингибировать до 75% экспрессии целевого гена.

Оценку изменения экспрессии FRA1 проводили на уровне мРНК и белка при помощи количественной ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга.

Опыты по сверхэкспрессии и ингибированию FRA1 проводили в пятикратной повторности, оценивали изменения экспрессии гена FRA1 генов-мишеней при помощи количественной ПЦР в реальном времени с последующим сравнением пороговых уровней амплификации (метод 2- $\Delta\Delta C_t$) и оценки достоверности различий при помощи непараметрических критериев Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова.

Результаты исследования

Оценка полногеномных профилей экспрессии при псориазе

В результате сравнительного полногеномного профилирования транскриптома кожи больных псориазом, проведенного на 14 парах биопсий больных псориазом, и последующего анализа с применением приложения DESeq пакета Bioconductor, были идентифицированы 1564 дифференциально экспрессированных гена (ДЭГ), из них 938 характеризовались повышенной экспрессией и 626 - пониженной. Анализ генных онтологий показал, что гены с повышенной при псориазе экспрессией связаны с двумя основными особенностями заболевания – с активацией иммунной системы (обогащенные онтологии иммунного ответа, хемотаксиса и созревания иммунных клеток), и с изменениями структурно-функциональных свойств эпидермиса (онтологии, связанные с ремоделированием внеклеточного матрикса, изменением скорости пролиферации и клеточного цикла). Гены с пониженной экспрессией относятся к PPAR-опосредованным сигнальным каскадам и различным метаболическим путям – метаболизма липидов, жирных кислот и глюкозы.

Поиск основных регуляторов транскрипции, связанных с псориазом

На основании полученных данных по дифференциальной экспрессии генов при псориазе с использованием базы данных взаимодействий приложения Interactome Metacore, был проведен анализ обогащений, который позволил выявить основные регуляторы ДЭГ: транскрипционные факторы STAT, NF κ B, T-bet, IRF, PU.1, AP-1, PPAR, C_EBP и другие (**Рисунок 1**).

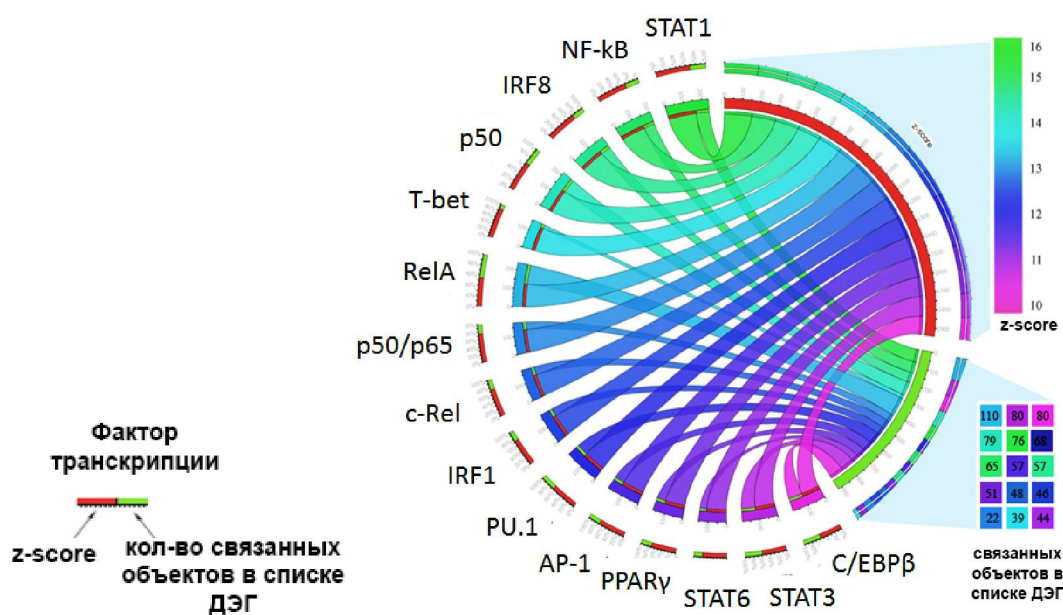


Рисунок 1. Диаграмма обогащений транскрипционных факторов по количеству их мишеней среди дифференциально экспрессированных генов (приведены 15 наиболее обогащенных факторов). Транскрипционные факторы ранжированы по z-score от большего к меньшему (от зеленого к красному на цветовой шкале справа), что отображает представленность мишеней данного транскрипционного фактора в списке ДЭГ. В правом нижнем углу диаграммы для каждого транскрипционного фактора указано количество связанных объектов в списке ДЭГ (цвет обозначает транскрипционный фактор в соответствии с его z-score, а число - количество связанных с этим ТФ объектов).

Помимо транскрипционных факторов, ассоциации которых с псориазом давно известны и активно изучаются, были идентифицированы регуляторы транскрипции, ранее не ассоциированные с псориазом в литературе (например, белки семейств HNF (FOXA), ELF, NFY и другие, всего 37 факторов транскрипции). Требуется проведение дальнейших исследований для оценки непосредственного вклада идентифицированных транскрипционных факторов в патогенез заболевания.

Анализ карт генных взаимодействий, обогащенных дифференциально экспрессированными при псориазе генами

Одним из наиболее приоритетных вопросов при изучении патогенеза псориаза является поиск триггера, запускающего манифестацию заболевания на молекулярном уровне. Накопленные данные позволяют выдвинуть гипотезу о важной роли структурных клеток кожи в манифестации псориаза, поскольку даже после успешного лечения и устойчивой ремиссии существует «остаточный профиль псориаза», который заключается в измененной экспрессии генов в

кератиноцитах, которая не возвращается к уровням экспрессии, наблюдаемым в коже здоровых людей (Suárez-Fariñas et al,2011).

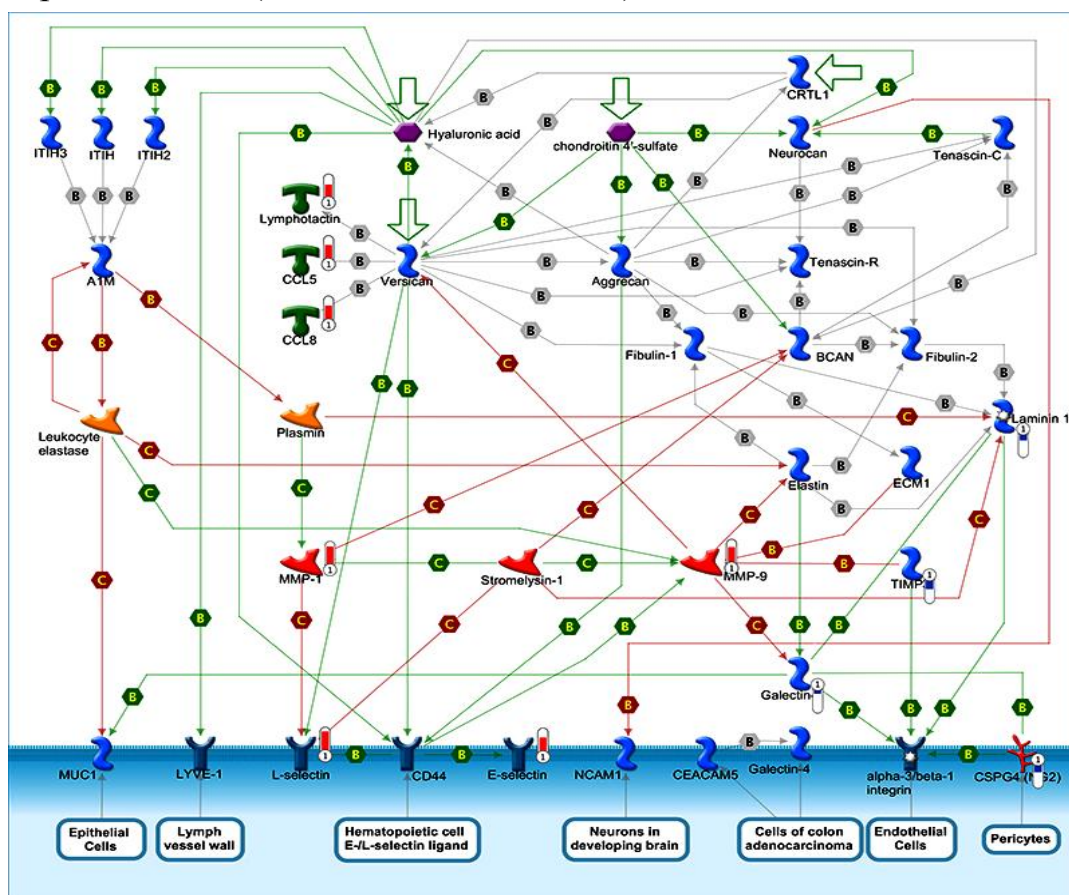


Рисунок 2. Карта сигнальных каскадов клеточной адгезии и ремоделирования внеклеточного матрикса. ■ - гены с повышенной экспрессией, ■ - гены с пониженной экспрессией.

Поэтому в данной работе в первую очередь представляла интерес идентификация вклада, который в развитие патологии несут структурные клетки кожи. Среди достоверно измененных сигнальных каскадов нами были выделены сети, связанные именно с изменениями кератиноцитов и структурно-функциональными изменениями эпидермиса, и проведен их анализ в контексте патогенеза заболевания.

На **рисунке 2** приведена карта сигнальных каскадов клеточной адгезии и ремоделирования внеклеточного матрикса, обогащенная ДЭГ по результатам проведенного полногеномного секвенирования. Среди генов с повышенной экспрессией были идентифицированы гены матричных металлопротеаз *MMP1, 9, 12, 25*, MMP-процессируемых хемокинов *CCL2,4,7,13, CXCL2,6,9*, цитокинов *IL-1β, IL8, TGFβ*, пониженной экспрессией характеризовались гены ингибиторов

матричных металлопротеаз *TIMP3* и *4*, компонентов клеточных мембран – ламинина и хондроитинсульфат протеогликана.

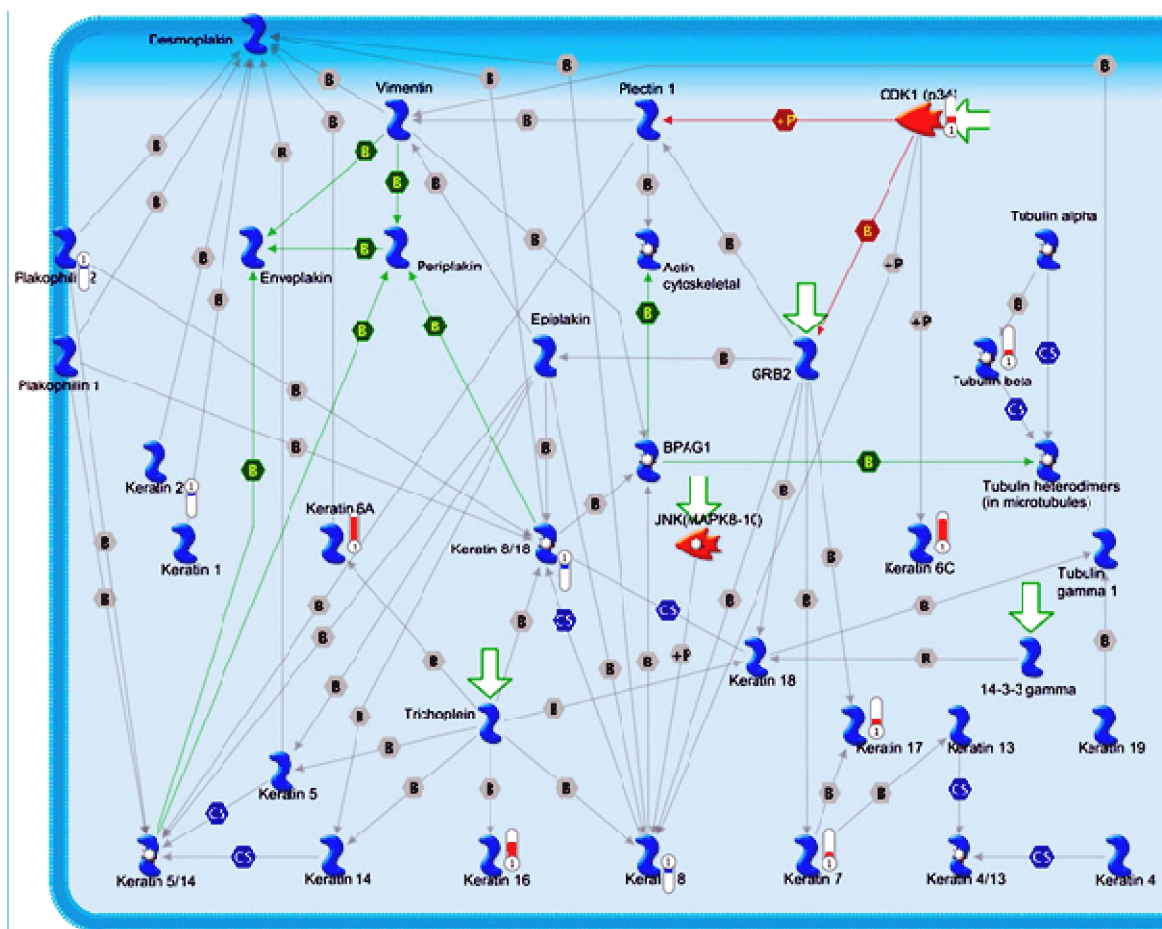




Рисунок 3. Карта сигнальных каскадов ремоделирования цитоскелета кератиноцитов.  - гены с повышенной экспрессией,  - гены с пониженной экспрессией.

Активация в коже больных псориазом сигнальных каскадов, которые отображены на данной карте, приводит к деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны, увеличению проницаемости капилляров, нарушению клеточной адгезии и десмосом, повышенной инфильтрации очага иммунными клетками, «разрыхлению» и утолщению эпидермиса, то есть образованию различных гистологических структур, характерных для псориазных повреждений. Как показал анализ литературы, основными транскрипционными регуляторами металлопротеаз являются транскрипционные факторы AP-1, PEA3, Sp1, CTNNB1/ TCF4 и NF-kB (Yan, Boyd, 2007, Bonnans et al, 2014).

Процессы ремоделирования внеклеточного матрикса и потери межклеточных контактов, в свою очередь, тесно связаны с процессами ремоделирования цитоскелета кератиноцитов и приводят к изменениям экспрессионных профилей кератиноцитов, снижению степени их

дифференцировки и увеличению пролиферативной активности. На **рисунке 3** приведена карта сигнальных каскадов ремоделирования цитоскелета, обогащенная ДЭГ. Данная карта отражает характерные особенности цитоскелета кератиноцитов при псориазе. Кератины 6A, 6C и 16, которые характеризовались повышенной экспрессией по результатам анализа, являются маркерами гиперпролиферации, кератины 2 и 8, экспрессия которых была понижена – маркерами терминальной дифференцировки, нарушенной при псориазе. Кроме того, кератин 8 участвует в каскадах TNF-опосредованной гибели клеток, которая также снижена при псориазе.

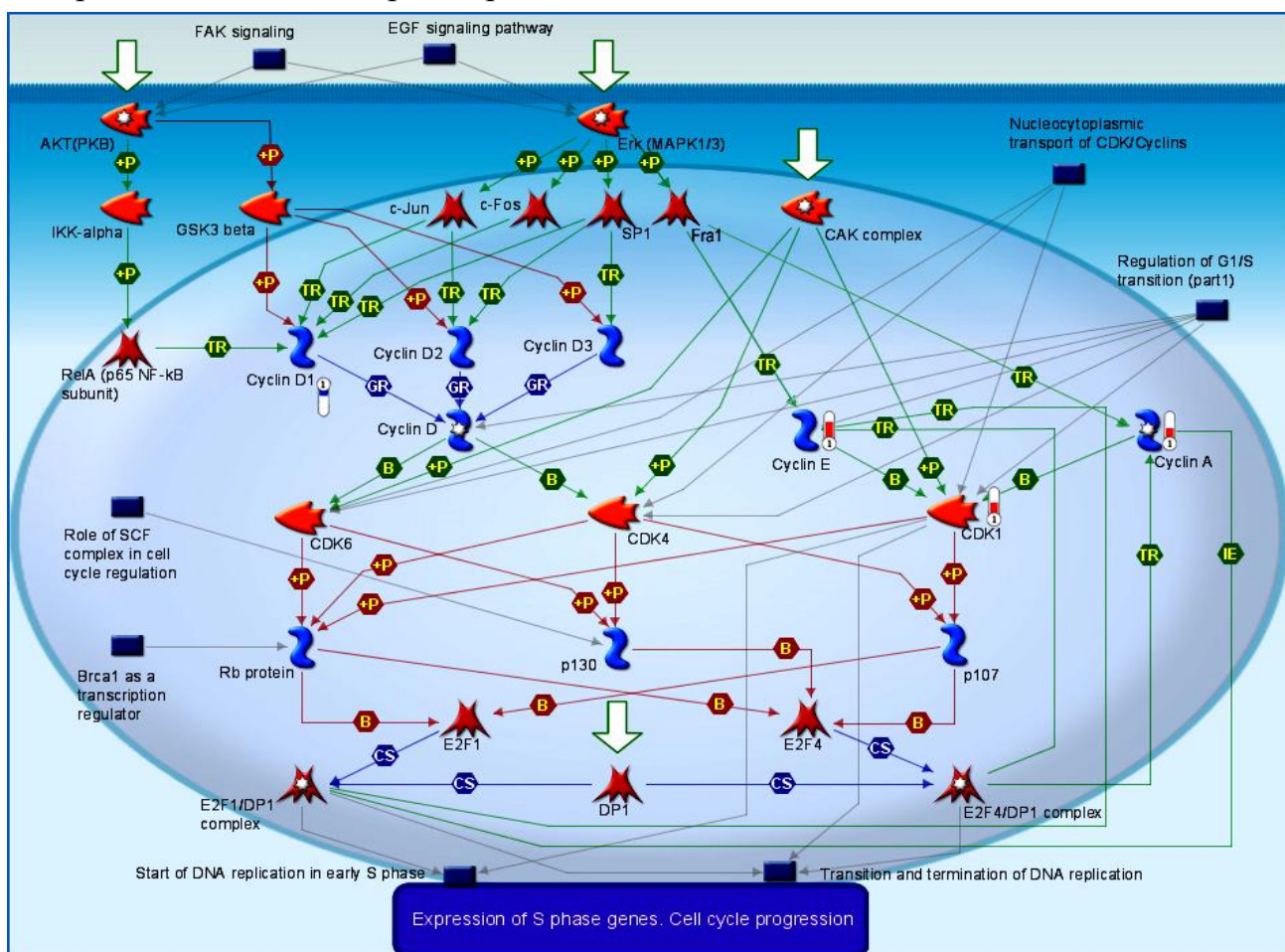


Рисунок 4. Карта сигнальных каскадов регуляции клеточного цикла и перехода к делению. 📌 - гены с повышенной экспрессией, 📉 - гены с пониженной экспрессией.

Анализ литературы показал, что экспрессия генов кератинов находится под регуляцией транскрипционных факторов AP-1, SP1, C/EBP, AP-2, ETS, RAR и RXR (Caulin et al,2000,Vaidya,2007; Törmä, 2011).

Нарушения жизненного цикла кератиноцитов при псориазе, их короткое время созревания для деления и активная пролиферация связаны с повышенной

экспрессией циклинов А и В и пониженной – циклина D, а также с измененной активностью циклин-зависимых киназ (рисунок 4). По результатам полногеномного анализа гены циклинов *CCNA2*, *B1*, *B2*, *E1* и киназ *CDK1*, *5* характеризовались повышенной экспрессией, а ген циклина *CCND1* – пониженной. По опубликованным данным регуляторами экспрессии генов циклинов являются факторы AP-1, Sp1, E2F, NFkB (Casalino L. et al., 2007).

Транскрипционный фактор AP-1 и его роль в развитии псориаза

По итогам анализа обогащений карт была выдвинута гипотеза о том, что транскрипционный фактор AP-1 является одним из основных регуляторов, приводящих к появлению «эффекторного паттерна псориаза». На первом этапе была проведена сравнительная оценка экспрессии всех членов AP-1 (*JUN*, *JUNB*, *JUND*, *FOS*, *FOSB*, *FRA1* и *FRA2*) в биопсиях кожи больных псориазом (n=13) методом количественной ПЦР в реальном времени. Проведенный анализ выявил достоверные различия уровней экспрессии только по гену *FRA1* (рисунок 5, А и В). Повышенную экспрессию *FRA1* в пораженной коже больных псориазом подтвердили на дополнительной выборке из 10 пациентов (рисунок 5, С).

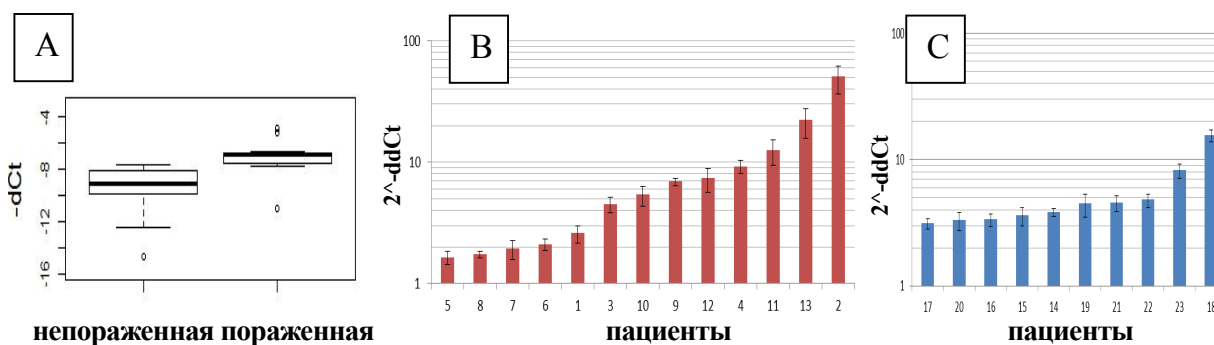


Рисунок 5. А. Экспрессия *FRA1* в визуально не пораженной и пораженной псориазом коже относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*. В и С. Сравнительные изменения экспрессии *FRA1* в пораженной псориазом относительно визуально непораженной кожи пациентов (p-value<0,05).

Оценка накопления белкового продукта данного гена при помощи иммуногистохимии подтвердила его сверхэкспрессию при псориазе (рисунок 6). Таким образом, было показано, что *FRA1* при псориазе характеризуется повышенной экспрессией на уровне мРНК и белка, и оценка экспрессии *FRA1*

может применяться в качестве маркера при разработке моделей псориазоподобного воспаления.

Результаты исследований позволили нам предположить, что именно FRA1 является основным компонентом гетеродимеров AP-1 в пораженной псориазом коже, и aberrантная активация гена *FRA1*, наблюдаемая при псориазе, а также накопление его белкового продукта, приводят к изменению экспрессии генов-мишеней и соответствующим проявлениям, характерным для псориаза.

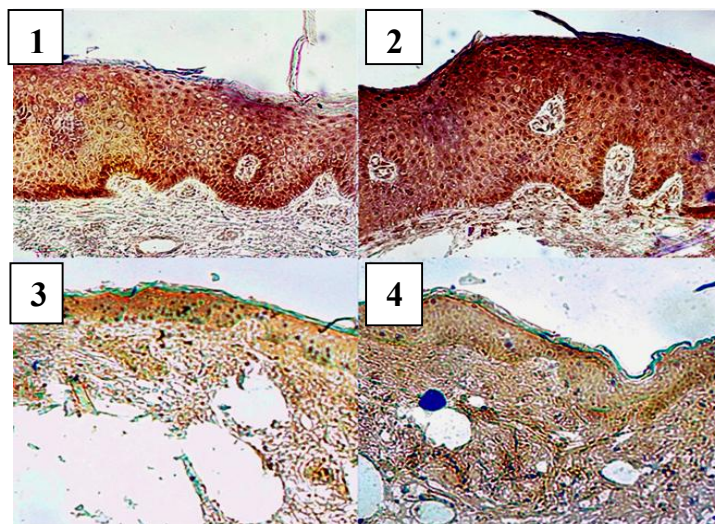


Рисунок 6. Иммуногистохимическое окрашивание срезов биопсий пораженной (1,2) и визуально не пораженной (3,4) псориазом кожи. 1,3 – антитела на нефосфорилированную форму FRA1, 2,4 – антитела на фосфорилированную форму FRA1.

Оценка регуляторного потенциала FRA1 на культуре клеток человека

Для проверки выдвинутого предположения были созданы конструкции для сверхэкспрессии или ингибирования *FRA1* в культуре клеток млекопитающих с последующей оценкой экспрессии генов-мишеней. Был проведен анализ литературных данных и выявлены гены-мишени FRA1, для которых показана непосредственная регуляция транскрипции данным транскрипционным фактором. Для анализа выбирали те из мишеней, которые были идентифицированы в качестве ДЭГ в ходе полногеномного анализа. Эти мишени были связаны с активной пролиферацией и нарушенной дифференцировкой кератиноцитов, и относились к разным картам генных взаимодействий. В анализ вошли гены металлопротеаз *MMP1*, *MMP9*, *MMP12*, хемоаттрактанта

CCL22/MCP1, гемоксигеназы *HMOX1*, циклина A2 *CCNA2*, урокиназного рецептора *PLAUR/CD87*, матриксного Gla-белка *MGP*.

Сверхэкспрессию *FRA1* осуществляли при помощи индуцибельной системы на основе модифицированной Tet-on Dox-системы (Urlinger et al, 2000). Для минимизации нецелевой экспрессии гена без индукции («подтекания» промотора) мы применяли систему из двух векторов, в которой экспрессия гена-мишени (*FRA1*) зависела от активности индуцибельного трансактиватора (rtTa). Опыты проводили на культуре клеток HaCaT – линии спонтанно иммортализованных кератиноцитов человека.

Сверхэкспрессию *FRA1* индуцировали путем добавления гидрохлорида доксициклина в культуральную среду к трансформированным клеткам до конечной концентрации 1 мкг/мл среды и последующим культивированием клеток в течение 48 (48h+DOX), 72 (72h+DOX) или 96 (96h+DOX) часов. В качестве контроля использовали стабильно трансформированные клетки без индукции доксициклином. Кроме того, для моделирования псориазоподобного воспаления после индукции сверхэкспрессии *FRA1* применяли инкубирование с провоспалительными цитокинами: через 48 часов после обработки доксициклином в культуральную среду на 24 часа добавляли коктейль из провоспалительных цитокинов (точка 72h+DOX+cyto) (IL-17, 50ng/ml, IFN γ , 10ng/ml, TNF α , 10ng/ml). В качестве контроля использовали клетки, обработанные цитокинами, без индукции доксициклином. Оценку изменений экспрессии *FRA1* осуществляли при помощи количественной ПЦР в реальном времени (**рисунок 7**). Было показано, что экспрессия *FRA1* через 48 часов увеличивалась почти в 10 раз, а, начиная с 72 часов, увеличивалась более, чем в 100 раз.

Следующим шагом стала оценка экспрессии генов-мишеней при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Оценка проводилась на той же кДНК, что и оценка изменений экспрессии *FRA1* (**рисунок 7**). Из всех проанализированных генов достоверными изменениями экспрессии в кератиноцитах, сверхэкспрессирующих *FRA1*, характеризовались только гены *MMP1*, *MMP12* и *CCNA2*. При этом добавление провоспалительных цитокинов значимо не изменяло уровни их экспрессии.

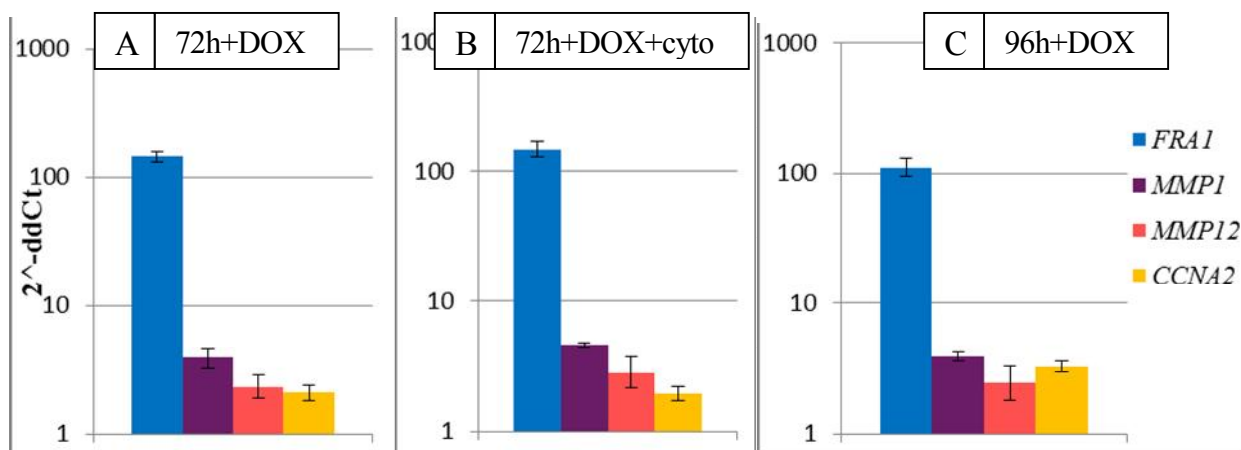


Рисунок 7. Изменения экспрессии генов-мишеней *FRA1* в стабильно трансфицированных клетках при индукции доксициклином (DOX) в течение 72 часов (A), 96 часов (C), 72 часов в индукцией доксициклином и провоспалительными цитокинами (DOX+cyto), (B) ($p < 0,05$).

Другим подходом для оценки регуляторного потенциала *FRA1* при регуляции экспрессии выбранных генов-мишеней стало ингибирование *FRA1* при помощи малых интерферирующих РНК. При помощи приложения BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen) были подобраны последовательности малых интерферирующих РНК, направленные к кодирующим последовательностям *FRA1*. Доставку малых интерферирующих РНК в клетки осуществляли при помощи трансфекции липидным агентом Metafectene PRO. Предварительно при помощи контрольной siRNA с флуоресцентной меткой была проведена отработка методики трансфекции для достижения максимального количества трансфицированных клеток (эффективность составила ~75-80% по визуальной оценке). Для выбора оптимальной последовательности siRNA, направленной к *FRA1*, осуществляли трансфекцию синтезированными малыми интерферирующими РНК с последующей инкубацией в течение 48 часов и оценкой эффективности ингибирования экспрессии *FRA1* методом количественной ПЦР в реальном времени (**рисунок 8,А**). Для дальнейших экспериментов была отобрана siRNA1, которая характеризовалась наиболее стабильным и высоким ингибированием экспрессии *FRA1*. Для дальнейших опытов использовали siRNA1 и соответствующую синтезированную контрольную siRNA (“scrambled” siRNA), которая состояла из тех же букв, что siRNA1, расположенных в произвольном порядке, и обработка которой не приводила к достоверным изменениям экспрессии анализируемых генов и морфологии клеток.

Оценка изменений экспрессии генов-мишеней при ингибировании *FRA1* проводилась через 48 или 72 часа после обработки малой интерферирующей РНК при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Проведенный анализ показал, что все гены-мишени, сверхэкспрессированные при сверхэкспрессии *FRA1*, при ингибировании *FRA1* характеризовались пониженной экспрессией ($p\text{-value}<0,05$) (рисунок 8, В,С).

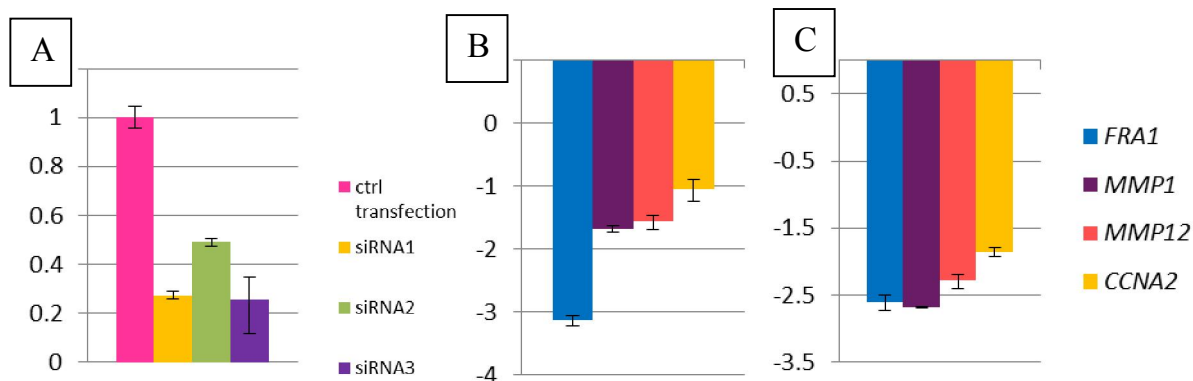


Рисунок 8. А. Остаточные уровни экспрессии *FRA1* в зависимости от последовательности siRNA. В, С. Ингибирование экспрессии мишеней *FRA1*, временные точки 48(В) и 72(С) часа ($p<0,05$).

Проведенные эксперименты подтвердили роль *FRA1* как регулятора транскрипции генов матриксных металлопротеаз и циклина A2 в кератиноцитах. Таким образом, в работе была подтверждена гипотеза о роли *FRA1* как регулятора транскрипции генов, экспрессия которых изменена в кератиноцитах при псориазе и связана с ремоделированием внеклеточного матрикса, а также изменениями пролиферативной активности и дифференцировки клеток, характерными для псориаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был проведен полногеномный анализ изменений экспрессии, характерных для псориаза. Проведенный анализ впервые указал на важную роль транскрипционного фактора *FRA1* как регуляторного звена, которое оказывает воздействие сразу на несколько процессов, связанных с развитием псориазического повреждения. Идентифицированные в ходе анализа молекулярные мишени и сигнальные каскады могут быть использованы при разработке моделей заболевания, кроме того, они могут выступать в качестве потенциальных мишеней для разработки терапии не только

иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, но и заболеваний, связанных с избыточным ремоделированием внеклеточного матрикса и aberrантной пролиферацией клеток.

ВЫВОДЫ

1. Проведенное сравнительное полногеномное профилирование транскриптома кожи больных псориазом позволило идентифицировать 1564 дифференциально экспрессированных гена, а также выявить, проанализировать и описать измененные при псориазе сигнальные каскады, которые играют ключевую роль в патогенезе заболевания.

2. В результате анализа обогащений сигнальных каскадов по функциям белковых продуктов были установлены ключевые факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов, связанных с патогенезом псориаза, а также идентифицированы регуляторы транскрипции, ранее не ассоциированные с псориазом, относящиеся к семействам HNF (FOXA), ELF, NFY.

3. В ходе исследования было показано, что одним из основных регуляторов дифференциально экспрессированных генов является транскрипционный фактор AP-1, в частности, его компонент FRA1, который, как было установлено, сверхэкспрессирован в коже больных псориазом на уровне мРНК и белка.

4. Опыты по индуцибельной сверхэкспрессии и ингибированию FRA1 в клетках кожи человека показали координированные изменения экспрессии его генов-мишеней *MMP1*, *MMP12*, *CCNA2*, идентифицированных в ходе анализа транскриптома, что говорит о важной роли FRA1 как регулятора сигнальных каскадов, измененных при псориазе, характерных для кератиноцитов кожи.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах списка ВАК:

1. Пирузян, Э.С. Изучение молекулярных механизмов патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на примере псориаза/ Э.С. Пирузян, В.В. Соболев, Р.М. Абдеев, А.Д. Золотаренко, А.А. Николаев, М.К.Саркисова, М.Е. Саутин, А.А. Ишкин, Ан.Л. Пирузян, С.А. Ильина, И.М.Корсунская, О.Ю. Рахимова, С.А. Брускин // Acta Naturae. – 2009. - №3. - С. 139 -149.

2. Соболев, В.В. Экспрессия гена FOSL1 при псориазе и атеросклерозе В.В. / Соболев, **А.Д. Золотаренко**, А.Г. Соболева, М.Е. Саутин, С.А. Ильина, М.К. Саркисова, Е.З. Голухова, А.М. Елкин, С.А. Брускин, Р.М. Абдеев // Генетика. – 2010. - Т. 46. - №1. - С. 104 - 110.
3. Соболев, В.В. Влияние экспрессии гена FOSL1 транскрипционного фактора AP-1 на псориазический процесс / В.В.Соболев, **А.Д.Золотаренко**, А.Г.Соболева, А.М.Елкин, С.А.Ильина, Д.Н.Серов, Н.Н.Потекаев, С.Б.Ткаченко, М.Т. Миннибаев, А.Л. Пирузян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. - Т. 150. - №11. - С. 564 - 567.
4. Соболева, А. Г. Генетически обусловленное ограничение использования клеток HaCaT в качестве модельной системы псориаза / А. Г. Соболева, **А. Д. Золотаренко**, В. В. Соболев, С. А. Брускин, Э. С. Пирузян, А. В. Мезенцев // Генетика. – 2014. - Т. 50. - №10. - С. 1222 – 1231.

Публикации в сборниках конференций:

1. Korsunskaya, I. Changes of transcription factor AP-1 gene expression in psoriasis pathogenesis before and after the treatment / I. Korsunskaya, V. Sobolev, A. Soboleva, **A. Zolotorenko**, D. Serov, A. Elkin, R. Abdeev, L. Egorenkova, A. Piruzyan // 18 Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology. Berlin, Germany. 2009. P. 1218.
2. **Золотаренко, А.Д.** Изучение роли транскрипционного фактора FRA1 в патогенезе псориаза / **А.Д. Золотаренко**, В.В. Соболев, А.Г. Соболева, С.А. Брускин, Э.С. Пирузян // Материалы первых международных Беккеровских чтений (научно-практической конференции). Волгоград. 2010. С.
3. **Zolotarenko, A.** Identification of new potential targets for psoriasis drug therapy / **A. Zolotarenko**, A. Ishkin, S. Bruskin // Abstracts of the European Molecular Biology Organization meeting. Barcelona, Spain. 2010. P. 92.
4. **Золотаренко, А.Д.** Создание клеточной модели для разработки лекарственных средств для лечения псориаза / **А.Д. Золотаренко**, С.А. Брускин // Материалы конференции: Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины - 2010. Москва. 2010. С. 38-40.
5. **Золотаренко, А.Д.** S100A7 и FRA-1 - маркеры степени тяжести псориазического процесса / **А.Д. Золотаренко**, С.А. Ильина, В.В. Соболев, С.А. Брускин // Материалы Четвертой Международной школы молодых ученых по

молекулярной генетике «Геномика и биология клетки». Звенигород, 29 ноября - 3 декабря 2010 г. С.94.

6. **Zolotareno, A.** Investigation of the role of S100 protein in skin pathology / **A. Zolotareno, S. Bruskin** // Abstracts 36th FEBS Congress Biochemistry for Tomorrow Medicine. Torino, Italy. 2011. P. 367.

7. **Zolotareno, A.** Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of psoriasis transcriptome / **A. Zolotareno, S. Bruskin** // Abstracts 37th FEBS Congress. Sevilla, Spain. 2012. P. 324

8. **Золотаренко, А.Д.** Полногеномное профилирование транскриптома кожи при псориазе / **А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин** // Материалы международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». Минск, Белоруссия. 2012. С.199.

9. **Золотаренко, А.Д.** Анализ транскриптома кожи при псориазе методом высокопроизводительного секвенирования РНК / **А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин** // Тезисы докладов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2012. С. 122.

10. **Золотаренко, А.Д.** Поиск ключевых изменений в транскриптоме кожи при псориазе методом полногеномного секвенирования / **А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин** // Тезисы докладов II конференции участников Российского биомаркерного сообщества «Биомаркеры 2013». Москва. 2013. С. 24.

11. Mezentsev, A. Lesional psoriatic skin: a comprehensive analysis of gene expression / A. Mezentsev, **A. Zolotareno, A. Soboleva, S. Bruskin** // Abstracts of 44th annual ESDR meeting. Copenhagen, Denmark. 2014. P. 63.

12. **Zolotareno, A.** The transcription factor FOSL1 and its role in psoriatic lesional skin / **A. Zolotareno, A. Soboleva, A. Mezentsev, S. Bruskin** // Abstracts of 44th annual ESDR meeting Copenhagen, Denmark. 2014. P. 58.

13. **Соболева, А.Г.** Особенности использования клеток HaCaT в качестве экспериментальной модели псориаза / **А.Г. Соболева, А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин, А.В. Мезенцев** // Материалы IV Международной научно-практической конференции Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. Казань. 2014. С. 61.

14. **Золотаренко, А.Д.** Анализ изменений генной экспрессии в поврежденной псориазом коже / **А.Д. Золотаренко, А.В. Мезенцев, А.Г. Соболева, С.А. Брускин** // Материалы IV Международной научно-практической конференции

Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. Казань. 2014. С. 60.

15. **Zolotareno, A.** New potential members of psoriatic transcriptional regulatory network / **A. Zolotareno**, S. Bruskin // Materials of Symposium “Inflammatory Skin Disease Summit: The Translational Revolution”. Vienna, Austria. 2014. P. 10.