

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЗОЛОТАРЕНКО АЛЕНА ДМИТРИЕВНА

**РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FRA1
В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА**

03.02.07 - генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
к.б.н. Брускин С.А.**

Москва 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Псориаз, генетика и иммунопатогенез заболевания	9
1.1.1. Генетика и эпигенетика псориаза	11
1.1.2. Иммунопатогенез псориаза	15
1.2. Сравнительный анализ различных методов изучения экспрессии генов	21
1.2.1. Исследование псориаза с помощью технологии микрочипов	22
1.2.2. Полногеномное секвенирование транскриптома при анализе патологий кожи	30
1.3. AP-1 и его роль в иммунитете и воспалении	34
1.3.1. Общие характеристики семейства AP-1	34
1.3.2. Семейство JUN	38
1.3.3. Семейство FOS: FOS, FOSB, FRA2	39
1.4. FRA1, его основные характеристики	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Биологический материал	45
2.2. Ферменты и реактивы	45
2.3. Клеточные линии и штаммы	46
2.4. Выделение РНК из кожи с применением реактива Trizol	46
2.5. Выделение РНК из кожи на колонках	47
2.6. Обратная транскрипция	48
2.7. Количественная ПЦР в реальном времени	48
2.8. Культивирование клеточных линий	50
2.9. Создание конструкций для гиперэкспрессии <i>FRA1</i>	51

2.10. Получение вирусных частиц для заражения клеток	53
2.11. Индуцибельная гиперэкспрессия <i>FRA1</i>	55
2.12. Вестерн-блот гибридизация	56
2.13. Ингибирование экспрессии <i>FRA1</i> методом РНК-интерференции	57
2.14. Иммуногистохимическое окрашивание при помощи системы визуализации NOVOLINK	59
2.15. Массивное параллельное секвенирование РНК по технологии SOLID 4	60
2.16. Статистическая обработка результатов	62
2.17. Обогащение генных сетей дифференциально экспрессированными генами при помощи программного пакета MetaCore	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1. Оценка полногеномных профилей экспрессии при псориазе	67
3.2. Сигнальные каскады, измененные при псориазе	73
3.3. Поиск основных регуляторов транскрипции, связанных с развитием заболевания	76
3.4. Карты генных взаимодействий, обогащенные дифференциально экспрессированными при псориазе генами	81
3.4.1. Ремоделирование внеклеточного матрикса	81
3.4.2. Ремоделирование цитоскелета кератиноцитов	85
3.4.3. Клеточный цикл и пролиферация	87
3.4.4. Цитокин-опосредованные сигнальные каскады	89
3.5. Транскрипционный фактор AP-1 и его роль в развитии псориаза	93
3.6. Оценка экспрессии генов AP-1 при псориазе	96
3.7. Оценка накопления белка <i>FRA1</i> в пораженной псориазом коже	99

3.8. Роль регуляции FRA1 и его гены-мишени	101
3.9. Изменения экспрессии мишеней при сверхэкспрессии <i>FRA1</i>	104
3.10. Изменения экспрессии мишеней при ингибировании <i>FRA1</i>	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	114
ПРИЛОЖЕНИЯ	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	130

ВВЕДЕНИЕ

Псориаз – многофакторное иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи, охватывающее 2-3% населения по всему миру (Parisi R. et al., 2013). Наиболее характерными особенностями патологии являются гиперпролиферация и нарушенная дифференцировка эпидермиса, измененные иммунологические и сосудистые профили кожи. Проявления псориаза могут варьировать по степени тяжести: от слабых, когда на теле больных присутствуют лишь несколько характерных псориазных бляшек, до крайне тяжелых, когда поражение затрагивает почти всю поверхность тела и суставы. Заболевание может значительно снижать уровень жизни и работоспособность больных (Garshick M.K. et al., 2015). Существуют установленные ассоциации между псориазом и другими заболеваниями – сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, диабетом, метаболическим синдромом и депрессией (Ryan C. et al., 2015). Молекулярно-генетические причины заболевания до сих пор до конца не установлены, хотя идентифицированы различные полиморфизмы, ассоциированные с псориазом, а также ряд триггерных факторов внешней среды, которые могут приводить к манифестации заболевания (Eder L. et al., 2015).

На сегодняшний день около 150 миллионов людей по всему миру страдают от псориаза. Только в США ежегодные затраты на лечение составляют порядка 12 миллиардов долларов, при этом существующие методы терапии позволяют лишь ослабить проявление симптомов и увеличить периоды ремиссии. Кроме того, исследования последних лет позволили выявить разделение псориаза на подтипы, в зависимости от которых пациенты могут по-разному отвечать на терапию. В некоторых случаях, несмотря на дорогостоящее и продолжительное лечение, состояние пациента может так и не улучшиться (Menter M.A. et al., 2015).

В то же время, благодаря стремительному развитию геномных и постгеномных технологий, в последние годы появились новые подходы для широкомасштабных исследований, позволяющие проводить полногеномный анализ экспрессии генов, а не только ее оценку на уровне отдельных генов или их групп. Такие исследования вкупе с соответствующим биоинформатическим анализом данных позволяют составлять карты и сети коэкспрессирующихся генов и их взаимодействующих белковых продуктов, связанных с развитием заболевания. Выявление основных регуляторных узлов позволит разработать новые подходы к терапии заболевания, модулирующие конкретные участки сигнальных каскадов, то есть осуществить более точные и специализированные воздействия, не нарушая систему целиком.

Семейство транскрипционных факторов 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 компоненты AP-1 могут играть важную роль в развитии данной патологии.

Все перечисленное подчеркивает актуальность изучения сигнальных каскадов, лежащих в основе патогенеза псориаза. Проведение полногеномной оценки экспрессии и последующего анализа измененных сигнальных каскадов и выявления их ключевых звеньев создадут основу для разработки новых стратегий терапии и персонализированного подхода к лечению больных, что позволит снижать затраты на лечение и позволят избегать возможностей возникновения таких нежелательных последствий терапии, как возникновение аутоантител или активация сопутствующих заболеваний.

Цель работы:

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.

Задачи:

- 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 осуществить сверхэкспрессию и ингибирование гена *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.

Положения, выносимые на защиту:

- Наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными при псориазе генами 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 работы:

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 дифференциально экспрессированными генами (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 представляла результаты в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимала участие в написании статей по результатам работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Псориаз, генетика и иммунопатогенез заболевания

Кожа является основным барьерным органом человека, а также высокоорганизованным периферическим органом иммунной системы, обладающим большим количеством разнообразных иммунокомпетентных клеток. Эти характеристики позволяют коже осуществлять ряд важных физиологических функций, поддерживающих гомеостаз организма: распознавание антигенного материала, его элиминацию, дифференцировку наивных иммунных клеток в различные эффекторные популяции, иммунологический надзор за опухолевыми клетками. Основную массу клеток кожи составляют кератиноциты, которые участвуют в иммунной защите, продуцируя широкий спектр цитокинов, хемокинов и ростовых факторов.

Нарушения функционирования иммунной системы часто приводят к развитию тяжелых заболеваний, таких, как иммунодефициты различной этиологии и иммуновоспалительные заболевания. Количество больных иммуноопосредованными заболеваниями возрастает с каждым годом: если в 2007 году в мире насчитывалось около 90 миллионов больных, то по данным 2014 года число больных одним лишь псориазом составляет около 120 миллионов (Shurin M.R. et al., 2007). Многие из иммуноопосредованных заболеваний носят хронический характер, а существующие методы лечения позволяют лишь снизить проявление симптомов, но не излечивают больных. Среди наиболее распространенных иммуноопосредованных заболеваний кожи – псориаз, экзема, дерматиты различной этиологии. Эти заболевания, как правило, не приводят к летальному исходу, однако, они могут значительно снижать уровень жизни больных и в ряде случаев заканчиваться инвалидностью (Rieder E. et al., 2012).

К клиническим проявлениям псориаза, как хронического воспалительного иммуноопосредованного заболевания кожи, относится избыточная пролиферация кератиноцитов, приводящая к образованию покрытых серебристо-белыми чешуйками псориазных бляшек, характеризующихся воспалением,

утолщением эпидермиса и паракератозом (Рисунок 1). Кроме того, в бляшках наблюдаются повышение инфильтрации кожи лимфоцитами, нейтрофилами, макрофагами и другими иммунными клетками, а также увеличение ангиогенеза, вазодилатация и эктазия (Мак R.К. et al., 2009). Псориазные бляшки, как правило, образуются в местах, подвергающихся трению – на локтях, коленях, пояснице, однако, они могут возникать практически в любом месте кожного покрова, включая волосистую часть головы, ладони и стопы.

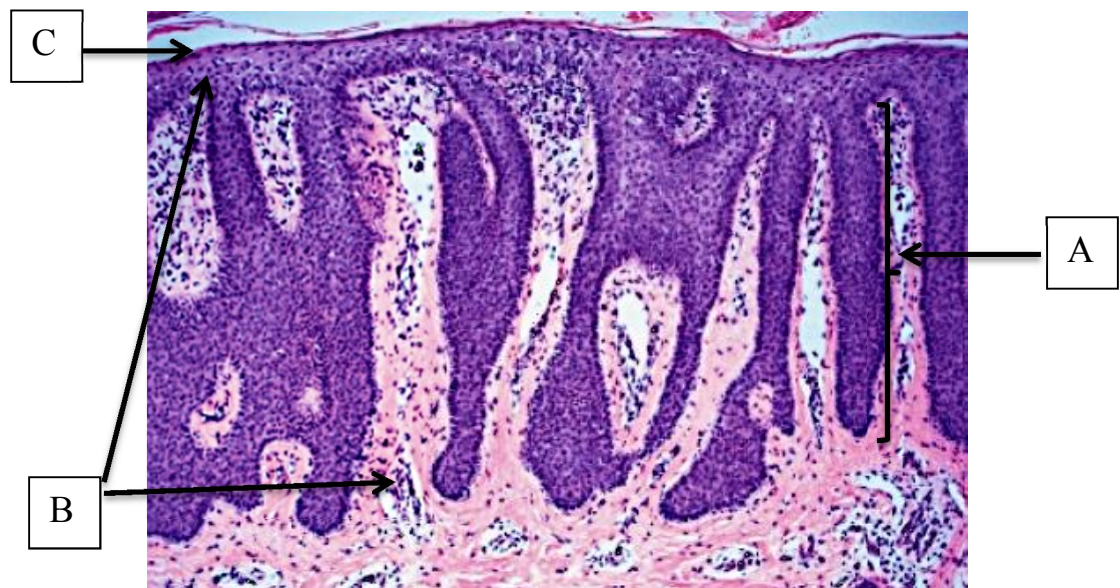


Рисунок 1. Гистологические характеристики псориаза. Наблюдается разрастание эпидермиса и увеличение эпидермальных гребней (А), большое количество клеток иммунного инфильтрата в дерме и эпидермисе (В), утончение рогового слоя эпидермиса (С) (Heidenreich R. et al., 2009).

Существуют несколько типов псориаза, которые различаются по локализации и степени тяжести. Наиболее распространенным из них является обыкновенный псориаз (до 90% всех случаев заболевания) – *Psoriasis vulgaris* (Мак R.К. et al., 2009). Некоторые авторы также выделяют псориазный артрит (псориазная артропатия, артропатический псориаз - *Psoriatic arthritis*) как один из типов псориаза – данное заболевание сопровождается воспалением суставов и соединительной ткани.

Псориаз возникает при сочетании генетической предрасположенности и провоцирующих факторов – стрессов, инфекций, лекарственных препаратов, химических и физических повреждений. Может наблюдаться так называемый

«феномен Кёбнера» - возникновение псориатических поражений на месте повреждения кожных покровов. Роль инфекционной этиологии в запуске развития псориаза хорошо известна в случаях бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Лекарственные препараты, например: β -блокаторы, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента, антималярийные препараты и литий, - также могут провоцировать развитие заболевания. Подсчитано, что эмоциональные стрессы являются триггерами псориаза у 23 % пациентов; лекарственные препараты – у 16 %; физические травмы (феномен Кёбнера) – у 43 %, инфекции в целом – у 14 % . Остальные 4 % случаев, возможно, провоцируются другими триггерными факторами (Piruzian E.S. et al., 2009). Заболеваемость не связана с полом: частота возникновения псориаза у мужчин и женщин одинакова. У 75% пациентов псориаз развивается до 40 лет, и некоторые исследователи подразделяют псориаз на ранний (Тип 1, первая манифестация заболевания в возрасте 20-30 лет) и поздний (Тип 2, первая манифестация заболевания в 50-60 лет) (Мак R.K. et al., 2009).

1.1.1. Генетика и эпигенетика псориаза

Существует генетическая предрасположенность к псориазу. Об этом свидетельствует более высокая конкордантность заболевания у монозиготных близнецов (65–72%), чем у дизиготных (15–30%) (Bowcock A.M. et al., 2004). Более 35 различных локусов статистически достоверно связаны с развитием псориаза (de Cid R. et al., 2009, Nair R.P. et al., 2009, Ellinghaus E. et al., 2010, Strange A. et al., 2010, Stuart P.E. et al., 2010, Sun L.D. et al., 2010, Ellinghaus D. et al., 2012, Tsoi L.C. et al., 2012). Они названы локусами предрасположенности к псориазу (Psoriasis Susceptibility Loci, PSORS) (Рисунок 2). При проведении генетических анализов семей с псориазом наиболее часто идентифицируют локус PSORS1 - область основного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, MHC) на хромосоме 6.

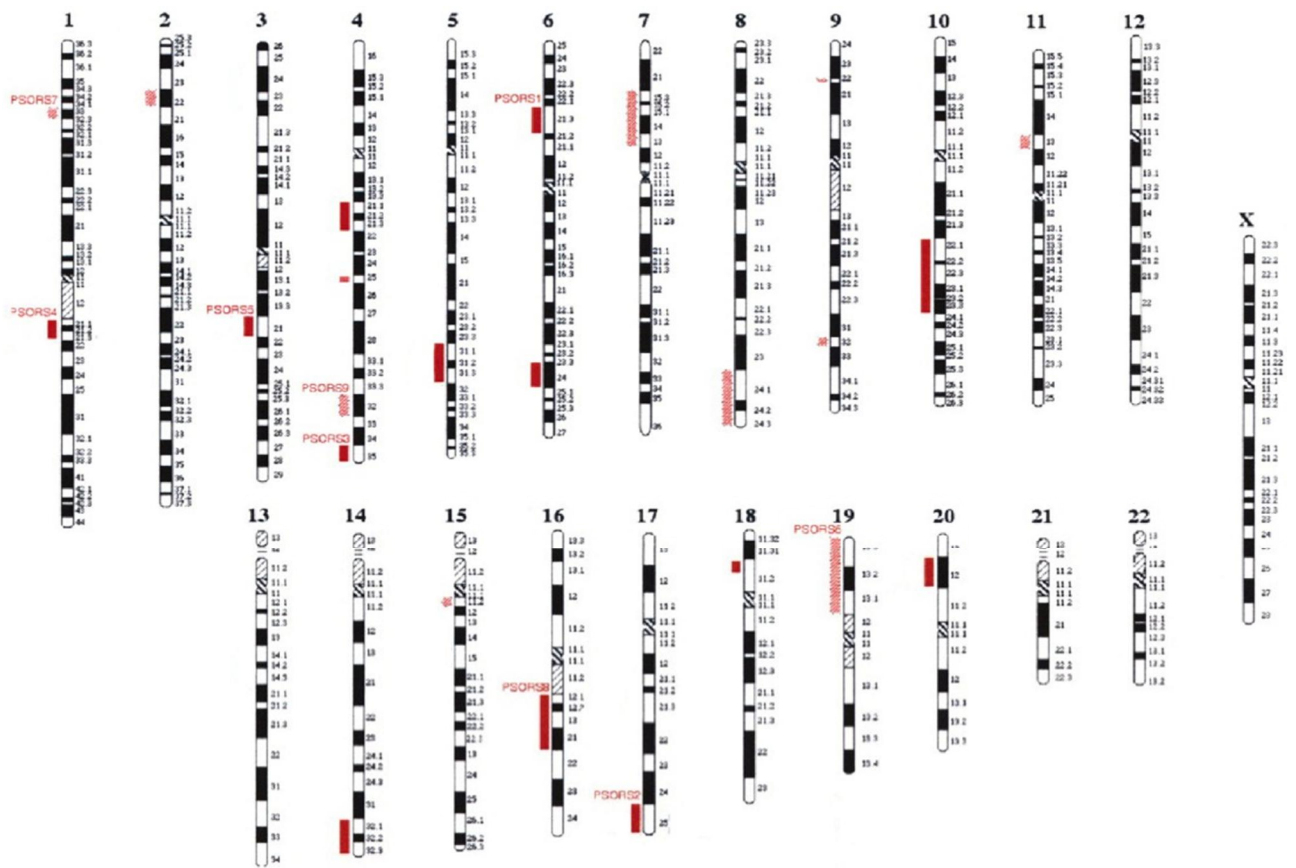


Рисунок 2. Расположение локусов предрасположенности к псориазу (PSORS) на хромосомах человека (Bowcock A.M. et al., 2004).

До 50% предрасположенности к псориазу обусловлены данным локусом. В локусе PSORS1 находится ген *HLA-C*, кодирующий лейкоцитарный антиген человека (Human Leukocyte Antigen-C). Аллель *HLA-Cw6* является основным аллелем риска возникновения заболевания (Mak R.K. et al., 2009). Данный аллель встречается у 60% больных псориазом (по сравнению с 15% встречаемости в популяции в целом), при этом у пациентов с ранней манифестацией заболевания он присутствует в 90% случаев, а у больных с поздней манифестацией заболевания - в 50% случаев. Вероятнее всего, роль *HLA-Cw6* связана с его участием в иммунном ответе при псориазе: антигенпрезентирующие клетки, например, дендритные клетки, могут презентировать процессированный на *HLA-Cw6* антиген CD8⁺T-клеткам, таким образом индуцируя запуск адаптивного иммунного ответа. Помимо этого, *HLA-Cw6* может взаимодействовать с иммуноглобулиноподобными рецепторами, присутствующими на клетках-

естественных киллерах (клетки NK и NKT), активируя иммунный ответ врожденного иммунитета (Gudjonsson J.E. et al., 2006).

Другими генами основного комплекса гистосовместимости (МНС), связанными с предрасположенностью к псориазу, являются гены, участвующие в иммунном ответе – например, ген *ERAP1*, который влияет на предрасположенность к псориазу у индивидуумов, несущих аллель риска HLA-C (Strange A. et al., 2010, Sun L.D. et al., 2010).

Кроме того, к различным локусам PSORS относятся гены, отвечающие за регуляцию Т-клеточных функций (*RUNX3, TAGAP, STAT3, ZNF313*) (Nestle F.O. et al., 2009, Tsoi L.C. et al., 2012), модуляцию Th2 иммунного ответа (*IL4, IL13*) (Nair R.P. et al., 2009), гены интерферон-опосредованного противовирусного ответа (*DDX58, NOS2*) (Stuart P.E. et al., 2010, Tsoi L.C. et al., 2012), активации макрофагов (*ZC3H12C*) (Tsoi L.C. et al., 2012), сигнальные каскады (NF)-κB (*CARD14, CARM1, NFKBIA*) (Strange A. et al., 2010, Tsoi L.C. et al., 2012), и сигнальные каскады TNF-α (*TNIP1, TNFAIP2, TNFAIP3*) (Nair R.P. et al., 2009, Ellinghaus E. et al., 2010, Sun L.D. et al., 2010). Среди генов интерлейкин-опосредованных сигнальных каскадов, локализующихся в локусах PSORS выделяют гены IL-12 (*IL12B*) (Zhang X.J. et al., 2009), IL-23 (*IL23A, IL23R, IL12B*) (Nair R.P. et al., 2009), гены *IL28RA* (Strange A. et al., 2010), *IL-4/IL-13* (Nestle F.O. et al., 2009).

Кроме перечисленных, в PSORS идентифицированы локусы, содержащие гены ороговения эпидермиса («позднего рогового конверта», late cornified envelope) - *LCE3B* и *LCE3C* (de Cid R. et al., 2009, Zhang X.J. et al., 2009), что подчеркивает роль нарушений барьерных функций кожи в развитии заболевания.

Среди генов, общих для разных иммуноопосредованных заболеваний кожи, отмечают гены *FBXL19, PSMA6-NFKBIA* и *RNF114* как обуславливающие предрасположенность к псориазу и псориатическому артриту (Stuart P.E. et al., 2010), локусы, объединяющие предрасположенность к псориазу и болезни Крона -

9p24 около *JAK2*, 10q22 в *ZMIZ1*, 11q13 около *PRDX5*, 16p13 около *SOCS1*, 17q21 в *STAT3*, 19p13 около *FUT2* и 22q11 в *YDJC* (Ellinghaus D. et al., 2012), и другие.

Помимо генетической предрасположенности важную роль в развитии псориаза играют эпигенетические модификации – метилирование ДНК и модификации гистонов, а также активность различных малых РНК – микроРНК, малых интерферирующих РНК и других некодирующих РНК (Sonkoly E. et al., 2005). Так, например, показано, что промоторы генов *p15* (ингибитор CDK4) и *p21* (ингибитор CDK2), играющих важную роль в регуляции пролиферации иммунных клеток, гипометилированы при псориазе, что приводит к изменению пролиферативной активности иммунных клеток - у больных псориазом в костном мозге количество колоний колониеобразующих клеток с высоким пролиферативным потенциалом (HPP-CFC) значительно ниже, чем у здоровых людей (Zhang K. et al., 2009). Другой ген, который характеризуется измененными уровнями метилирования при псориазе, это ген *SHP-1*, отрицательный регулятор митогензависимой активации пролиферации, один из двух промоторов которого в кератиноцитах больных псориазом значительно деметилирован (Ruchusatsawat K. et al., 2006).

Связь модификаций гистонов и псориаза изучена недостаточно подробно. На сегодняшний день показано снижение уровня ацетилирования гистона H4 в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) больных псориазом, причем выявлена отрицательная корреляция между уровнем ацетилирования и тяжестью заболевания (Zhang P. et al., 2011). Уровень ацетилирования гистона H3, так же, как и уровень метилирования H3K4/H3K27, в приведенном исследовании достоверно не различались.

Анализ различных популяций малых РНК выявил более 80 микроРНК, а также различные малые интерферирующие РНК и другие типы малых РНК, дифференциально экспрессированные в пораженной псориазом коже больных по сравнению с визуально непораженной кожей (Joyce С.Е. et al., 2011, Xia J. et al., 2013, Lovendorf M.B. et al., 2014).

1.1.2. Иммунопатогенез псориаза

В патогенезе псориаза участвуют различные типы клеток: за манифестацию заболевания в первую очередь отвечают структурные клетки кожи – кератиноциты, а за его развитие и прогрессию – в основном, иммунные клетки.

В норме именно кератиноциты первыми сигнализируют иммунной системе о патогенах и повреждениях. Встречаясь с патогеном, кератиноциты идентифицируют консервативные микробные структуры, называемые PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), через свои рецепторы опознавания образа (PRR, Pattern Recognition Receptors). Одной из основных групп PRR являются Толл-подобные рецепторы (TLRs), которые находятся на мембране (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6) и в эндосомах (TLR-3 и TLR-9) кератиноцитов. В случае появления бактериальной, вирусной или фунгальной инфекции именно TLR узнают характерные для патогена структуры и запускают каскады врожденного иммунитета, приводя к активации транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и IRF, которые, в свою очередь, запускают каскады иммунной защиты и воспаления, приводя к повышению продукции цитокинов и хемокинов, например фактора некроза опухоли (TNF- α) и гамма-интерферона (IFN- γ) (Di Meglio P. et al., 2011).

Другим способом ограничить инвазию патогенов и защитить поврежденную область кожи является активация в цитоплазме кератиноцитов крупного мультибелкового олигомерного комплекса, называемого инфламмасомой, и последующая продукция большого количества провоспалительных цитокинов (Feldmeyer L. et al., 2010). Эти процессы приводят к активации каспазы-1, которая процессирует предшественники IL-1 β и IL-18, находящиеся в кератиноцитах. Активированные кератиноциты продуцируют зрелые IL-1 β и IL-18, активируя соседние эпителиальные клетки и приводя к возникновению петли амплификации сигнала путем продукции IL-1 α , IL-1 β , TNF- α и IL-6 (Di Meglio P. et al., 2011).

Еще один путь сигнализирования о патогенах и повреждениях, который функционирует в кератиноцитах, - это продукция различных антимикробных

пептидов (Curwen V. et al.). Среди них – кателицидин (LL-37), дефензины и белки S100. В норме данные пептиды осуществляют защиту от бактерий, грибов и вирусов, кроме того, они могут служить для привлечения иммунных клеток в очаг поражения. При псориазе наблюдается значительное повышение экспрессии генов AMP, обусловленное тем, что экспрессия многих из них регулируется провоспалительными цитокинами (например, IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ и TNF- α), в большом количестве присутствующими в очаге поражения при псориазе, а также к запуску петли аутоамплификации (Nakatsuji T. et al., 2012).

На сегодняшний день предполагаемая модель развития заболевания такова (Рисунок 3): под воздействием факторов внешней среды у индивидуумов, несущих локусы предрасположенности к псориазу, происходит инициация заболевания. Белки LL-37, продуцируемые кератиноцитами в ответ на травму или на другие провоцирующие факторы, связываются с фрагментами собственной ДНК или РНК, которые выделяют умирающие или находящиеся под воздействием стресса клетки. В таких комплексах нуклеиновые кислоты защищены от деградации. Комплексы LL-37 с нуклеиновыми кислотами узнаются рецепторами плазмоцитарных дендритных клеток (pDC) и транспортируются в эндосомные компартменты pDCs, где активируют TLR9 и TLR7 и запускают продукцию IFN- α (Farkas A. et al., 2012). Кроме того, продуцируемые кератиноцитами в ответ на провоцирующие факторы цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α , комплексы LL-37 с нуклеиновыми кислотами, а также IFN- α , активируют дермальные дендритные клетки (DDC), которые при этом начинают продуцировать TNF- α и IL-6 (Ganguly D. et al., 2009, Di Meglio P. et al., 2011). Часть активированных DDC мигрирует в лимфоузлы, а остальные становятся провоспалительными дермальными дендритными клетками (iDDC), продуцирующими IL-23, TNF- α и большое количество оксида азота NO, который играет важную роль в подавлении активности бактериальных и опухолевых клеток, а также усиливает воспалительное окружение, поскольку образует большое количество свободных радикалов. Одновременно в очаге воспаления

накапливается супероксид, который вызывает повреждение белков и липидов клеточных мембран, что объясняет его цитотоксическое действие на клетки. Под воздействием провоспалительного окружения моноциты (Mo), циркулирующие в крови, мигрируют в кожу. Эти моноциты являются потенциальными предшественниками дендритных клеток, и под воздействием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), продуцируемого кератиноцитами, нейтрофилами, макрофагами, тучными клетками, лимфоцитами и фибробластами, могут развиваться в дендритные клетки (так называемые moDCs). Этому процессу способствует IFN- α , продуцируемый pDCs, а также комплексы ДНК и РНК с LL37, которые ускоряют фенотипическое и физиологическое созревание moDCs, активированных IFN- α . В дальнейшем moDCs сами продуцируют интерфероны, участвуя в дальнейшей амплификации популяции этого типа клеток (Farkas A. et al., 2012).

Активированные DDC в лимфоузлах презентируют антиген наивным T-лимфоцитам, вызывая их дифференцировку в популяции T-хелперов 1, 17 и 22 (Th1, Th17, Th22), а также цитотоксических T-лимфоцитов 17 (Tc17).

Кератиноциты выделяют хемокины CCL20 и CCL17, что вызывает миграцию Th17 и Tc17, несущих рецепторы CLA, CCR4 и CCR6, по лимфатическим и кровеносным сосудам в псориатическую дерму. Продуцируемый iDDC IL-23A активирует Th17 и Tc17, которые начинают продуцировать провоспалительные цитокины - IL-17A, IL-17F, IL-22 и IFN- γ . IL-17A и IL-17F влияют на кератиноциты, которые начинают более активно продуцировать хемокины и AMP, привлекающие нейтрофилов и Th1, Th17 и Th22. Нейтрофилы, инфильтрирующие эпидермис, а также тучные клетки в дерме, продуцируют большое количество провоспалительных медиаторов, в том числе IL-17A, внося свой вклад в создание провоспалительного окружения. Цитотоксические CD8+ T лимфоциты, несущие интегрин VLA-1, накапливаются в эпидермисе, также продуцируя IL-17A. Привлекаемые кератиноцит-продуцируемыми хемокинами и созданным провоспалительным окружением, в очаг поражения мигрируют Th1 и

Th22, продуцируя цитокины, например, IL-22, который регулирует экспрессию генов, ассоциированных с дифференцировкой кератиноцитов, регулирующих мобильность и миграцию кератиноцитов, антимикробных пептидов, ростовых факторов и хемокинов, участвующих в ремоделировании тканей, ангиогенезе и фиброзе (Di Meglio P. et al., 2011). Таким образом продуцируемые лейкоцитами интерлейкины индуцируют эпидермальную гиперплазию, нарушая дифференцировку кератиноцитов. Кроме того, в очаге поражения Т-хелперы могут регулировать созревание моноцитов в дендритные клетки. Путем продукции GM-CSF, TNF- α , IFN- γ и прямого клеточного контакта Т-хелперы воздействуют на моноциты, приводя к их созреванию в mDC различных популяций: Th1 приводят к образованию mDC, секретирующих IL-12, Th17 – дендритных клеток, секретирующих IL-1 β , IL-6 и IL-23, Th-22-DC пока не изучены (Farkas A. et al., 2012).

Описанная последовательность взаимодействий различных типов клеток приводит к образованию псориазической бляшки, которая характеризуется акантозом (утолщением шиповатого слоя эпидермиса), папилломатозом (удлинением сосочков дермы в эпидермис и, наоборот, удлинением эпидермальных тяжей в папиллярную дерму), гипогранулезом (истончением зернистого слоя эпидермиса), а также паракератозом (нарушением процесса ороговения эпидермиса, при котором клетки рогового слоя сохраняют ядра).

Расшифровка механизма иммунопатогенеза псориаза позволила создать новый класс лекарственных средств для лечения данного заболевания - так называемые «биологические препараты» или «биолоджики». Лекарства данного типа могут применяться для лечения пациентов, которые не отзываются на лечение системными иммуносупрессантами (Galvan-Banqueri M. et al., 2013). В настоящее время на разных стадиях клинических исследований находятся новые лекарственные препараты, мишенями которых являются различные белки, участвующие в тех или иных звеньях патологического процесса: JAK, PDE4, IL-17, IL-17R, IL-23.

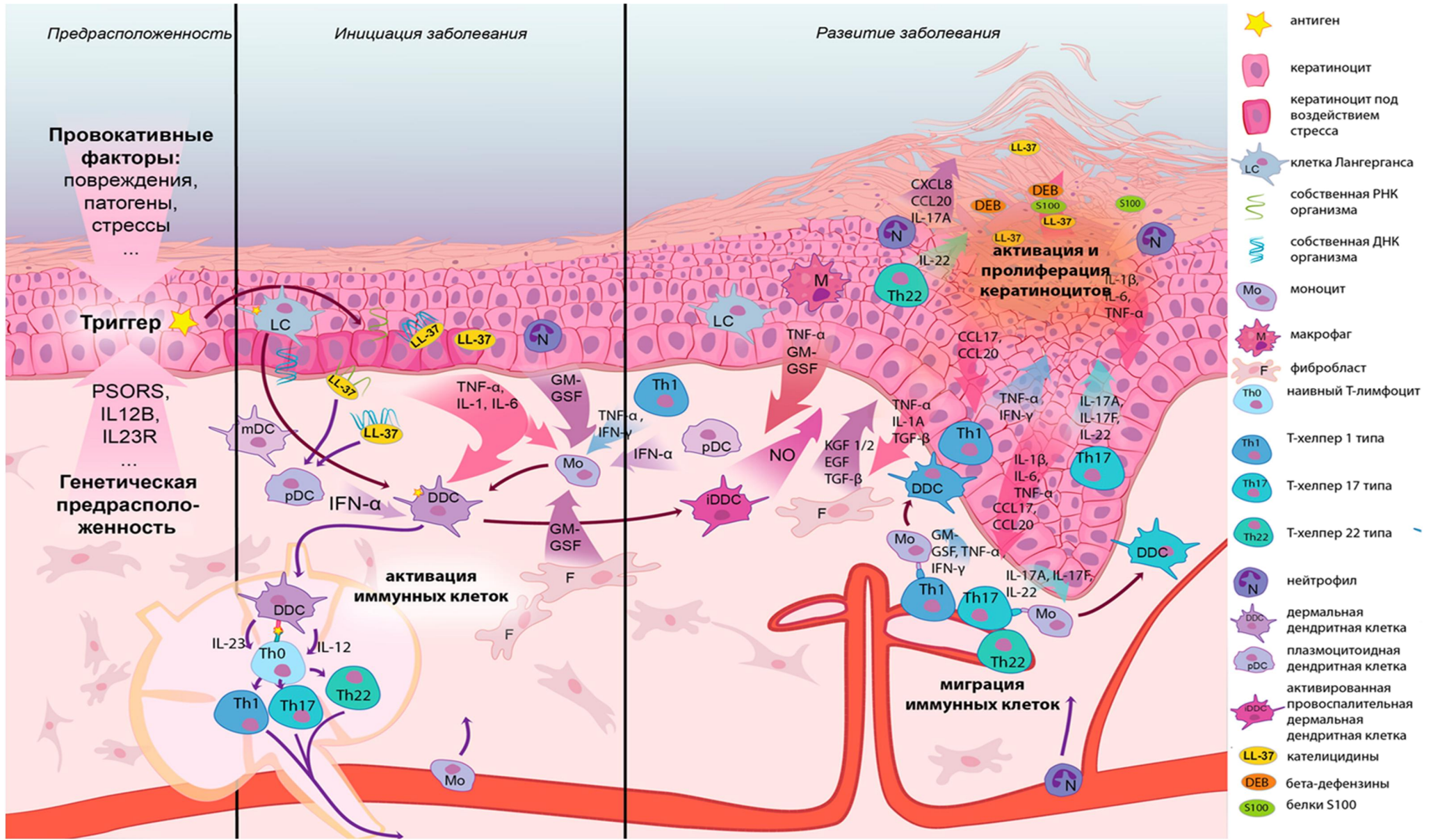


Рисунок 3. Предлагаемая модель иммунопатогенеза псориаза (Рисунок автора, описание в тексте).

Несмотря на то, что основные события, приводящие к развитию псориаза, уже идентифицированы, существуют невыясненные «белые пятна» в его патогенезе. На сегодняшний день окончательно не известна природа антигена, приводящего к дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в популяции Th1, Th17, Tc17 и Th22. Тот факт, что около 20% больных не отзываются на анти-TNF и анти-IL-12+анти-IL-23 терапию, говорит нам о возможных альтернативных путях развития заболевания, которые не идентифицированы на сегодняшний день. Кроме того, существование так называемого «молекулярного шрама» - остаточного геномного профиля болезни, измененной экспрессии некоторых генов, которая после успешного лечения заболевания не возвращается к нормальным показателям, позволяет выдвинуть предположение об аномалиях, лежащих в основе заболевания и не связанных с активностью иммунных клеток. Некоторые из генов, входящих в «молекулярный шрам», характеризуются сниженным уровнем метилирования, что говорит о возможной роли данной эпигенетической модификации в развитии заболевания (Tian S. et al., 2012).

Что касается нарушений, присущих эпидермису больных псориазом, исследования показали, что даже визуально непораженная кожа больных псориазом характеризуется измененными рН и уровнем гидратированности, а также замедленной кинетикой восстановления барьерных функций. Такие изменения эпидермиса приводят к воспалению и эпидермальной гиперплазии, и последующим активации цитокинового шторма и инфильтрации провоспалительными клетками (Ye L. et al., 2014).

Кроме того, результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что, помимо измененной экспрессии различных генов и транскрипционных факторов, связанных с воспалением (Schonthaler H.B. et al., 2011), в развитии заболевания могут играть роль микроРНК, проявляющие дифференциальную активность в коже в норме и при патологии (Schneider M.R., 2012), а также эпигенетические модификации (Zhang P. et al., 2012).

1.2. Сравнительный анализ различных методов изучения экспрессии генов

Анализ изменений экспрессионных профилей генов, связанных с развитием тех или иных патологий, лежит в основе системного подхода к изучению заболеваний и к разработке новых методов их терапии. Для определения функциональности различных элементов генома необходимо оценивать их активность и получать данные об индукции или репрессии генов на разных этапах жизни клетки, а также в ответ на влияние различных факторов, в норме и патологии. С развитием технологий исследований и накоплением знаний появляются новые методы, которые позволяют проводить параллельную оценку профилей экспрессии большого количества генов более эффективно.

Высокопроизводительные методы анализа генома появились в молекулярно-генетической практике в середине 1990-х. В распоряжении исследователей оказались подходы, которые дали возможность в сотни раз увеличить скорость накопления информации о последовательности, структуре и свойствах ДНК, РНК и белков. На сегодняшний день наиболее распространенными методами оценки экспрессии генов являются микрочипы (microarray), полногеномное секвенирование транскриптома (RNA-seq) и количественная ПЦР в реальном времени (qPCR). Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки.

Экспрессионные микрочипы – это относительно недорогой высокопроизводительный метод анализа, который может быть автоматизирован, однако, он характеризуется низким динамическим диапазоном ($\sim 10^2$) и низкой разрешающей способностью, плохой воспроизводимостью, большим количеством ошибок, особенно, для слабо экспрессирующихся генов, а также невозможностью оценки абсолютного уровня экспрессии и проведения *de novo* анализа для тех организмов, геном которых еще не секвенирован.

Полногеномное секвенирование транскриптома – это более точный метод, который характеризуется более широким динамическим диапазоном ($\sim 10^4$ - 10^5), возможностью оценки абсолютного уровня экспрессии и проведения *de novo* анализа для тех организмов, геном которых еще не секвенирован, возможностью

аннотации новых генов, слабой чувствительностью к мутациям в геноме и достаточно хорошей воспроизводимостью. К недостаткам данного метода можно отнести высокую стоимость (которая довольно быстро снижается в силу быстрого развития технологий), низкую производительность и сложность приготовления библиотек.

Еще один метод, количественная ПЦР в реальном времени, характеризуется наиболее широким динамическим диапазоном ($\sim 10^6$), максимальной воспроизводимостью, возможностью практически полностью автоматизировать процесс, а также оценивать абсолютный уровень экспрессии генов. Однако, с помощью этого метода невозможно аннотировать новые гены и проводить *de novo* анализ несеквенированных геномов, кроме того, при отсутствии автоматизированных систем он требует больших трудозатрат и является малопродуктивным.

Итак, у каждого из приведенных методов есть свои плюсы и минусы, и, вероятно, в будущем сохранятся все три технологии, при этом экспрессионные чипы и количественная ПЦР в реальном времени будут применяться как тест-системы для решения конкретных задач, а полногеномное секвенирование будет использоваться для более фундаментальных исследований биологии и медицины.

В следующих подразделах приведены краткие описания исследований, посвященных анализу изменений экспрессии генов при псориазе, выполненных при помощи микрочипов и полногеномного секвенирования транскриптома. Поскольку в современных исследованиях количественная ПЦР в реальном времени в силу низкой производительности применяется в основном для верификации результатов, полученных при помощи других методов анализа, автор не приводит результаты исследований, в которых использовалась только количественная ПЦР в реальном времени.

1.2.1. Исследование псориаза с помощью технологии микрочипов

Первые статьи по оценке изменений экспрессии генов при псориазе с помощью микрочипов появились в начале 2000х. В исследовании *Wowscock et*

al.(Bowcock A.M. et al., 2001) при сравнении 15 образцов пораженной и непораженной кожи больных псориазом и 6 образцов кожи здоровых людей, проведенном на микрочипе Affymetrix U95A, содержащем более 12000 проб, были идентифицированы 177 дифференциально экспрессированных генов. Наиболее дифференциально экспрессированными оказались гены, кодирующие белки S100, TCN, SERPINB, CD47, IL8, ECGF1 и STAF50. Многие из обнаруженных дифференциально экспрессированных генов картировались в локусах предрасположенности к псориазу (например, в локусах 1q21, 3q21 и 14q31-32).

За «пилотным» исследованием последовали и другие. В том же году Oestreicher с коллегами (Oestreicher J.L. et al., 2001) опубликовали результаты анализа 24 пар образцов, проведенного на чипе HU6800, содержащем около 7000 проб. В ходе исследования были идентифицированы 159 дифференциально экспрессированных генов, большинство из которых картировалось в 6 известных на тот момент локусах предрасположенности к псориазу. Экспрессия этих генов изменялась в ответ на лечение заболевания ингибиторами кальциневрина или NF- κ B путей, задействованных в сигнальных каскадах воспаления. Было выдвинуто предположение, что гены из этого списка могут стать мишенями для разработки новых методов лечения, а также выступить в качестве предсказательных маркеров для оценки исхода лечения.

В 2003 году было опубликовано исследование, в котором для анализа использовались уже более 63 000 олигонуклеотидных проб (Zhou X. et al., 2003). С помощью Affymetrix GeneChips U95A, B, C, D и E были проанализированы 16 образцов пораженной псориазом кожи, 18 образцов непораженной кожи и 8 образцов здоровой кожи. В результате было идентифицировано 1,338 дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ), а также выделили наиболее измененные биологические процессы. Результаты исследования позволили идентифицировать 11 хемокинов, ранее не ассоциированных с патогенезом заболевания, а также предложить новую модель заболевания, связанную с критической ролью дендритных клеток в активации Т-клеток и прогрессии

воспаления. Кроме того, анализ промоторов коэкспрессирующихся генов позволил идентифицировать предполагаемые сайты посадки транскрипционных факторов в промоторах ДЭГ. Список включал в себя сайты связывания NFκB, AP-1, IRF2-ISRE, GATA-1-EVI1, PPAR-ОСТ1 и других транскрипционных факторов, большинство из которых связано с регуляцией пролиферации и дифференцировки клеток, а также иммунного ответа и воспаления.

Изучение роли транскрипционных факторов в развитии псориаза продолжили Kulski et al. (Kulski J.K. et al., 2005), которые анализировали образцы кожи семи пациентов из Японии на микрочипе Affymetrix GeneChips U95A. Были идентифицированы изменения белковых профилей кожи, связанные с измененной активностью различных протеаз и их ингибиторов, а также связанные с этим изменения в процессах презентации антигенов. Впервые была выдвинута гипотеза о роли транскрипционного фактора JUNB в развитии псориаза, которая говорила о том, что JUNB может влиять на пролиферацию эпидермиса, поскольку регулирует ген *CCND1*, который, в свою очередь, является регулятором клеточного цикла. В целом, исследователи охарактеризовали псориаз как хроническое IFN- и Т-клеточно-опосредованное иммунное заболевание кожи, при котором нарушения клеточной структуры и дифференцировки эпидермиса возникают в результате аномальных молекулярных сигналов противовирусной защиты, вызывающих неадекватный иммунный ответ.

Для того чтобы оценить вклад изменений экспрессии генов в иммунных клетках в развитие псориаза, в исследовании Koczan et. al., 2005 (Koczan D. et al., 2005) на чипе Affymetrix U95A были проанализированы 11 образцов, полученных из РВМС больных псориазом до и после лечения заболевания. Были идентифицированы 18 генов, из них наибольшим уровнем дифференциальной экспрессии характеризовались *IL-8*, *ANXA3*, *TNFAIP6*, *COX-2*, *G0S2*, *PBEF*, *S100P*, экспрессия которых до лечения была повышена. Кроме того, были выделены три пары генов (*IL-8* - *CDKN1C/p57*, *PTGS2* - *NR1D2*, *DSC2* - *CDKN1C/p57*), которые

позволяли эффективно проводить дифференциальную диагностику и оценивать стадию развития заболевания.

Авторы другого исследования (Reischl J. et al., 2007) изучали возможную роль Wnt-зависимого пути в развитии псориаза. Поскольку в развитии заболевания важную роль играют гиперпролиферация кератиноцитов и их неполная терминальная дифференцировка, была изучена роль, которую при псориазе играет Wnt-зависимый путь, который участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. Проанализировав пары биопсий кожи 20 больных, они идентифицировали 179 генов с более чем двукратным изменением экспрессии, 16 из них были ассоциированы с каноническим Wnt/ β -катениновым или с неканоническим Wnt/Ca²⁺ путями передачи сигнала. Экспрессия *WNT5A* в пораженной коже была повышена в 4 раза, экспрессия *Wnt4* и *WNT16* не изменялась, а *WNT7B* была незначительно снижена. Экспрессия двух ингибиторов Wnt-зависимого пути, *FRZB* и *DKK2*, а также циклина D, была понижена в пораженной коже. Однако, осталось невыясненным, является ли повышенная экспрессия *WNT5A* причиной псориаза, или компенсаторной реакцией организма на заболевание.

Для выявления характерных для псориаза изменений в коже Yao et al. (Yao Y. et al., 2008) проанализировали 26 пар биопсий кожи больных, 21 биопсию кожи здоровых и 5 непарных образцов пораженной кожи с помощью Affymetrix human genome U133 plus v2.0. Они обнаружили устойчивое повышение экспрессии генов, участвующих в IFN- α , IFN- β , IFN- γ и TNF- α -индуцируемых сигнальных каскадах, и белковых продуктов IFN -индуцируемых генов *STAT1* и *ISG15*.. Авторы предположили, что повышенная экспрессия интерферонов I типа и ассоциированных с ними генов в пораженной коже указывают на возможность использования данных генов для разработки новых методов терапии псориаза.

В более новом исследовании авторы (Johnson-Huang L.M. et al., 2012b) смогли проанализировать крупную выборку из 85 пар образцов пораженной и непораженной кожи больных псориазом (от средней до тяжелой степени

поражения). Анализ с помощью GeneChip HG U133 Plus 2.0 позволил идентифицировать 4175 ДЭГ. 12 из 20 генов с наиболее повышенной экспрессией характеризовались аддитивным или синергетическим ответом на воздействие IL-17 и TNF, что, по мнению авторов, указывало на роль данных цитокинов в образовании «топовых» профилей генной экспрессии, вероятно, в фенотипических проявлениях заболевания.

Необходимо также отметить исследование Nair et al. (Nair R.P. et al., 2009), в котором при помощи Affymetrix U133 Plus 2.0 провели анализ 180 образцов, 58 пар биопсий больных и 64 биопсий кожи здоровых людей. Помимо оценки экспрессии был проведен поиск однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с патогенезом заболевания. Были проанализированы 1409 образца, взятых у больных, и 1436 контрольных образца от здоровых доноров. Из 438670 идентифицированных полиморфизмов были выделены 21 с потенциальной ролью в патогенезе заболевания (локусы *HLA-C*, гены сигнальных каскадов IL23 (*IL23A*, *IL23R*, *IL12B*), мишени TNF- α , регулирующие сигнальные каскады NF- κ B (*TNIP1*, *TNFAIP3*), а также два гена, Th2 иммунного ответа (*IL4*, *IL13*)), некоторые из них характеризовались измененной экспрессией. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что экспрессия некоторых аллелей *HLA-C* и генов *IL23A* и *IL12B* в коже больных псориазом является ключевым событием в прогрессии заболевания

Актуальной задачей является сравнение профилей экспрессии до и после лечения псориаза. В исследовании (Johnson-Huang L.M. et al., 2012a) пары биопсий, взятых у 4 пациентов до лечения, через 12 недель после лечения биолоджиком эфализумабом, а также после рецидива заболевания, были проанализированы при помощи Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array. Большинство генов, характеризовавшихся повышенной экспрессией в очагах воспаления при псориазе, под воздействием эфализумаба снижали свою экспрессию, однако, после рецидива она вновь увеличивалась. Было выдвинуто предположение, что после прекращения воздействия эфализумаба отмена

блокады CD11 α приводит к быстрой миграции иммунных клеток в кожу и образованию новых псориатических повреждений.

Роль различных цитокинов в патогенезе псориаза до сих пор однозначно не определена. В одном из последних исследований в качестве ключевого цитокина в развитии псориаза был выделен IL-17 (Krueger J.G. et al., 2012). Было проведено рандомизированное двойное слепое исследование эффективности лечения хронического псориаза со среднетяжелым и тяжелым течением путем инъекций моноклонального антитела к IL-17, иксекизумаба. 46 пациентов получали 3 подкожные инъекции антитела или плацебо с интервалом в 2 недели. Иммуногистохимический анализ показал, что ингибирование IL-17 приводило к снижению пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, уменьшению продукции хемоаттрактантов и соответствующему уменьшению инфильтрации лейкоцитами. Профилирование на микрочипе Affymetrix HGU133a 2.0. показало, что среди генов, значительно снизивших свою экспрессию, были IL-19, который индуцирует эпидермальную гиперплазию, IL-8 и CXCL1, которые могут привлекать нейтрофилы в очаги воспаления, CCL20, который может привлекать Т-хелперы 17 и миелоидные дендритные клетки, гранзим Б - эффекторная молекула цитотоксических Т-клеток, а также липокалин - белок, активно продуцируемый в ответ на IL-17. Кроме того, была проанализирована взаимосвязь ингибирования отдельных популяций Т-клеток и улучшения состояния пациентов. Было обнаружено, что ингибирование белков, участвующих в IL-17-зависимых сигнальных каскадах (DEFB4, липокалин 2, IL-8, и CXCL-1), приводило к улучшению состояния кожи пациентов, при этом уровни мРНК *IL-17A* или *IL-17F* не коррелировали с улучшением. Был сделан вывод, что на ранних стадиях улучшение состояния пациентов под воздействием иксекизумаба происходит за счет воздействия на клетки мишени (например, кератиноциты), а не на иммунные клетки. Кроме того, ингибирование генов IL-17-зависимого сигнального пути оказывает большее влияние на состояние больных, нежели ингибирование IFN- γ -зависимых генов (таких, как *CXCL10* и *MX-1*).

В другом эксперименте анализировался провоспалительный потенциал IFN- γ и его роль в развитии воспаления при псориазе (Johnson-Huang L.M. et al., 2012b). 10 здоровых волонтеров и пациентов со слабым проявлением псориаза получали однократные подкожные инъекции интерферона гамма (Actimmune, 1×10^6 IU) в клинически непораженные области кожи. Перед инъекцией и через 24 часа после у них брали биопсии, из которых затем выделяли РНК и проводили гистохимический анализ и профилирование на микрочипе Human Genome U133 2.0. Разовая инъекция IFN- γ не приводила к видимым изменениям кожи, однако, значительно изменяла гистологические и экспрессионные профили в коже, приводя к образованию характерных для псориаза изменений генной экспрессии, а также миграции провоспалительных дендритных клеток и Т-клеток в очаг инъекции и развитию воспаления. IFN- γ индуцировал продукцию хемокина CCL19 и образование кластеров Т-клеток и дендритных клеток в коже. Авторы обратили внимание на сходный ответ на IFN- γ в непораженной коже больных псориазом и в коже здоровых людей и сделали из этого вывод о «вторичной» роли IFN- γ в развитии псориаза, которая состоит в развитии воспаления, индуцированного ранее. Кроме того, у больных наблюдается более высокая восприимчивость IFN- γ , чем у здоровых людей, что может быть связано с полиморфизмами в генах *IL4* и *IL13*, приводящими к снижению их противовоспалительной активности.

В работе Mitsui с коллегами (Mitsui H. et al., 2012) для того, чтобы оценить вклад отдельных популяций клеток в развитие заболевания, использовалась лазерная захватывающая микродиссекция – метод изоляции отдельных клеток из образца ткани, в данном случае – из биопсии псориазической бляшки. Из трех образцов были выделены клетки эпидермиса, папиллярной дермы, ретикулярной дермы и клетки из дермальных воспалительных агрегатов. С помощью профилирования, проведенного на микрочипе Affymetrix HGU133A2.0, и статистической обработки, осуществленной с помощью GeneSpring GX10.0 и R/Bioconductor, исследователи смогли разделить эпидермис и дерму по профилям

экспрессии, как в пораженной, так и в непораженной коже. В пораженной коже в эпидермисе наблюдалась повышенная экспрессия генов, связанных с гиперпролиферацией (*KRT6A*, *KRT6B* и *KRT16*), эпидермальной дифференциацией (гены белков S100 и малых пролин-богатых белков) и протеолизом (гены серпинов и *PI3*), транскрипционных факторов, связанных с пролиферацией кератиноцитов (*NFE2L3*, *MAFF* и *EHF*), и пониженная экспрессия регуляторов дифференцировки кератиноцитов (*LASS6*, *TFAP2B* и *GATA3*). В очагах воспаления в дерме экспрессировалось большое количество генов, регулирующих организацию и структуру лимфоидной ткани и иммунный ответ (*CCL19* и рецептор его продукта *CCR7*, *LAMP3/DC-LAMP*, *CD28*, *GZMB*, *CD83*), – что может быть объяснено присутствием воспаления, опосредованного Т-клетками. Данные микрочипов были подтверждены иммуногистохимическими исследованиями и методом qPCR. Исследователи предположили ключевую роль дендритных клеток в развитии воспаления при псориазе. В целом, в статье (Mitsui H. et al., 2012) в качестве одного из ключевых механизмов, запускающих развитие заболевания, был предложен CCL19/CCR7 путь активации иммунных клеток.

С увеличением количества проведенных исследований по технологии микрочипов на первый план вышла проблема низкой воспроизводимости результатов. Списки дифференциально экспрессированных генов, идентифицированные при помощи различных платформ, зачастую слабо пересекаются. Поэтому ряд исследователей предприняли попытки разработать подходы для некой «предобработки», позволяющей максимально унифицировать необработанные данные, с тем, чтобы их можно было объединить и проанализировать получившуюся крупную выборку. Одним из успешных результатов применения такого подхода стала статья Bigler et al. (Bigler J. et al., 2013), в которой были проанализированы результаты восьми исследований, проведенных на близких версиях микрочипов Affymetrix, что позволило им идентифицировать более 16000 достоверно дифференциально экспрессированных проб. При этом применение ограничений по уровню изменения экспрессии

(изменения экспрессии в 2 и более раз) позволило получить списки генов с высокой воспроизводимостью во всех проанализированных наборах данных. Тем не менее, был отмечен низкий динамический диапазон, присущий исследованиям, проведенным при помощи микрочипов, а также высокий уровень фонового шума и кросс-гибридизации при анализе слабо представленных проб. Все вышеперечисленное может ограничивать достоверность полученных данных.

1.2.2. Полногеномное секвенирование транскриптома при анализе патологий кожи

Поскольку секвенирование нового поколения – это достаточно молодой метод, на сегодняшний день опубликовано ограниченное число статей, в которых описывается применение метода для исследования различных заболеваний кожи. Что касается анализа транскриптома больных псориазом при помощи полногеномного секвенирования, на сегодняшний день опубликованы 3 статьи с применением данного метода, (Joyce С.Е. et al., 2011, Jabbari А. et al., 2012, Xia J. et al., 2013, Li В. et al., 2014, Lovendorf М.В. et al., 2014, Swindell W.R. et al., 2014) кроме того, издано несколько статей с применением секвенирования нового поколения для анализа представленности различных микроРНК в коже больных и поиске возможной роли микроРНК в заболевании (Xia J. et al., 2013, Lovendorf М.В. et al., 2014, Joyce С.Е. et al., 2011).

В пилотном исследовании Jabbari с коллегами (Jabbari А. et al., 2012) были проанализированы полногеномные профили экспрессии в трех парах пораженной и визуально непораженной псориазом кожи. Полученные списки дифференциально экспрессированных генов сравнивали с опубликованными транскриптомными данными. Были выделены дифференциально экспрессированные гены, впервые ассоциированные с псориазом, - 776 генов с повышенной экспрессией и 1035 генов с пониженной при псориазе экспрессией. Эти гены в дальнейшем могут быть использованы в качестве мишеней для разработки новых методов терапии заболевания.

Наиболее крупное на сегодняшний день исследование, в котором RNA-seq применяли для анализа дифференциальной экспрессии при псориазе (Li B. et al., 2014), содержит результаты секвенирования ДНК, полученной с мРНК, выделенной из 92 псориатических биопсий и 82 образцов нормальной кожи. Были идентифицированы 3,577 ДЭГ (с применением ограничений $|\log_2FC| \geq 1$ и $p < 1 \times 10^{-6}$, что соответствовало p-value с поправкой на множественные сравнения < 0.025), из них 1049 генов характеризовались повышенной экспрессией, а 2528 – пониженной. Проведенный анализ коэкспрессирующихся генов позволил исследователям выделить среди ДЭГ группы генов со сходными изменениями экспрессии, обусловленные вкладом разных типов клеток в развитие заболевания. Другой особенностью данного исследования стало то, что 42 из проанализированных образцов (20 образцов пораженной кожи и 22 здоровой) были анализированы ранее при помощи микрочипов (Gudjonsson J.E. et al., 2009), что позволило авторам провести сравнительный анализ подходов. В целом для высоко- и средне-представленных транскриптов изменения экспрессии, идентифицированные обоими методами, согласовались достаточно хорошо. В отношении низкопредставленных транскриптов чувствительность RNA-seq оказалась гораздо выше, чем при применении микрочипов, что позволило идентифицировать ранее не ассоциированные с псориазом гены. Более того, при сравнении пересечений списков ДЭГ оказалось, что 80% ДЭГ, идентифицированных при помощи микрочипов, также детектировались при помощи RNA-seq, однако, лишь 22% ДЭГ, идентифицированных при помощи полногеномного секвенирования транскриптома, присутствовали в списках, полученных при помощи микрочипов.

Сравнение результатов полногеномного анализа транскриптома (3 пары биопсий) и восьми исследований, выполненных при помощи микрочипов (217 пар образцов), которое провели Swindell с коллегами (Swindell W.R. et al., 2014), показало достаточно высокую согласованность между списками идентифицированных ДЭГ. При этом различия в списках авторы объяснили

влиянием представленности мРНК транскриптов, длины генов и GC-состава. RNA-seq в силу более широкого динамического диапазона лучше идентифицировал низкоэкспрессирующиеся гены, чем микрочипы, хотя, в целом, оба метода характеризовались заниженными значениями экспрессии этого типа генов, что, по мнению авторов, может объясняться характерной структурой псориазных бляшек. Гены большей длины лучше идентифицировались при помощи RNA-seq в силу большего количества картирующихся на них прочтений, однако RNA-seq был больше подвержен влиянию GC-состава генов. Авторы подчеркнули взаимную комплементарность двух методов и предположили совместное использование обоих методов в дальнейшем, что сделает анализ экспрессии более глубоким и точным.

Современные геномные методы позволяют анализировать не только дифференциальную экспрессию белок-кодирующих генов и внегенных участков, но также идентифицировать новые микроРНК и анализировать изменения экспрессии уже известных. С помощью профилирования 67 образцов пораженной и непораженной псориазом кожи были идентифицированы 613 известных микроРНК и 284 предполагаемых новых микроРНК локуса (Joyce С.Е. et al., 2011). Цифровой анализ экспрессии генов в коже больных псориазом позволил оценить изменения экспрессии микроРНК, которые приводят к изменениям в функционировании кератиноцитов (*miR-135b*, *miR-205*, *miR-203-AS*), иммунных клеток (*miR-142-3p*) и сосудистых профилей (*miR-21*, *miR-31*, *miR-378*) в коже. Были идентифицированы 80 известных и 18 новых микроРНК, достоверно изменивших свою экспрессию в 2 и более раз в пораженной псориазом коже. Кроме того, в пораженной и визуально непораженной коже наблюдалась экспрессия различных изоформ микроРНК, а также процессы редактирования микроРНК. Было выдвинуто предположение о том, что микроРНК могут в будущем выступить в качестве терапевтических агентов для лечения заболеваний кожи, и данное исследование является первым шагом к реализации этой цели.

Результаты данного исследования анализировались также в статье Xia et al (Xia J. et al., 2013), где путем анализа 670 миллионов прочтений 67 библиотек малых РНК были идентифицированы 21 новых неканонических микроРНК (3 производных малых ядерных РНК (snoRNA), 2 производные тРНК, 16 микроРНК, локализованных в интронах белок-кодирующих мРНК), и 39 новых эндогенных малых интерферирующих РНК (endo-siRNA). 15 неканонических микроРНК или эндогенных малых интерферирующих РНК были идентифицированы как дифференциально экспрессированные в пораженной псориазом коже по сравнению с кожей здоровых людей. Был сделан вывод, что малые некодирующие РНК могут выступать в роли регуляторов экспрессии генов в коже и играть важную роль в патогенезе псориаза.

В исследовании Lovendorf et al (Lovendorf M.V. et al., 2014) секвенирование нового поколения применяли на 6 парах биопсий совместно с лазерной микродиссекцией для того, чтобы идентифицировать микроРНК, специфично экспрессирующиеся при псориазе в эпидермисе и в иммунном инфильтрате дермы. Были идентифицированы 24 микроРНК, дифференциально экспрессированных при псориазе в эпидермисе, и 37 – в дерме, при этом дифференциальная экспрессия 9 из 37 микроРНК иммунного инфильтрата дермы ранее была идентифицирована в РВМС больных псориазом. При помощи количественной ПЦР в реальном времени и проточной цитометрии исследователи показали специфичность экспрессии идентифицированных miR-193b и miR-223 для клеток Th17, играющих ключевую роль в патогенезе псориаза.

Подводя итог, можно отметить, что целями исследований в практической дерматологии являются улучшение методов диагностики, получение информативных прогнозов о результатах терапии, разработка новых высокоэффективных методов лечения. С дальнейшим удешевлением методики и снижением временных затрат на анализ, полногеномное секвенирование нового поколения может стать одной из основ для персонализированной медицины. Получение полногеномных профилей экспрессии, характерных для различных

заболеваний кожи, позволит проводить раннюю и точную диагностику и будет способствовать разработке высокоспецифичных и эффективных подходов к лечению.

1.3. AP-1 и его роль в иммунитете и воспалении

1.3.1. Общие характеристики семейства AP-1

AP-1 (Activating Protein 1) – это семейство транскрипционных факторов, состоящее из структурно и функционально близких белков семейств JUN (JUN, JUNB, JUND) и FOS (FOS, FOSB, FRA1, FRA2), члены которого участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза, клеточного ответа на ряд внеклеточных факторов и различных сигнальных молекул. Активация AP-1 также происходит в экстремальных для клеток условиях: при тепловом шоке, гипоксии, под воздействием токсинов, ультрафиолетовой и ионизирующей радиации (Karin M. et al., 1997). AP-1 впервые был идентифицирован в конце 1980х годов как белок, имеющий высокое сродство к семинуклеотидной последовательности в раннем промоторе SV40 (Harshman K.D. et al., 1988).

Белки семейства AP-1 регулируют базальный уровень экспрессии многих генов, содержащих в промоторной области сайты связывания данного транскрипционного фактора: семинуклеотидную консенсусную последовательность 5'-TGAG/CTCA-3', также известную как TRE (TРА-Responsive Element), либо восьминуклеотидную последовательность TGACGTCA (CRE, сAMP Responsive Element). Кроме того, они регулируют экспрессию генов в ответ на различные физиологические и патологические воздействия, в том числе цитокины, ростовые факторы, сигналы стресса, бактериальные и вирусные инфекции, онкогенные воздействия (Hess J. et al., 2004). Члены семейства имеют структуру «лейциновой застежки-молнии» (Basic Region Leucine Zipper, bZIP). Данная структура является эволюционно консервативной и характерной для многих транскрипционных факторов. С-терминальный домен «лейциновой застежки» отвечает за димеризацию, которая необходима для осуществления

регуляторных функций, а также за специфичность и стабильность димеров, а N-терминальный домен – за связывание транскрипционного фактора с ДНК (Рисунок 4) (Hess J. et al., 2004).

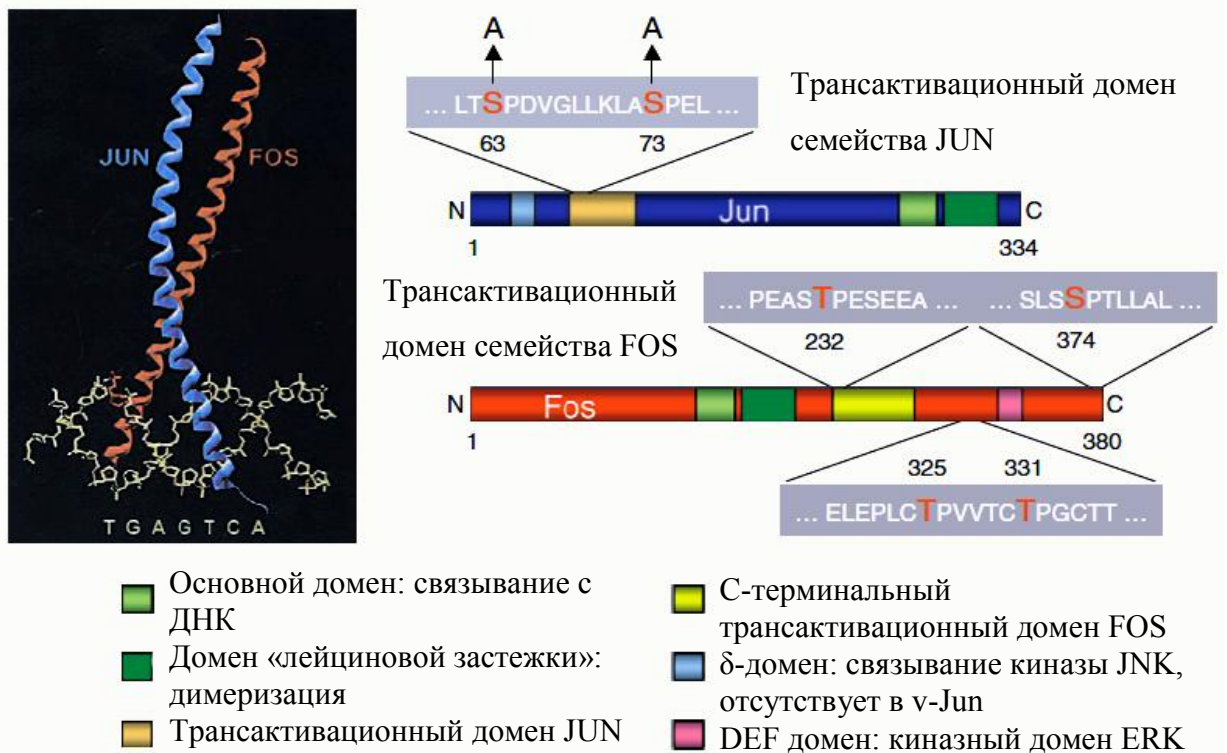


Рисунок 4. Гетеродимер JUN-FOS. Домены bZIP двух белков формируют X-подобную α -спираль, которая связывается с палиндромом TGAGTCA. Последовательность белка JUN показана синим, FOS – красным, кроме того, показаны трансактивационные и киназные домены (Hess J. et al., 2004).

Белки семейства JUN могут образовывать как гомо-, так и гетеродимерные комплексы. Белки семейства FOS не могут образовывать гомодимеры и функционируют лишь в виде комплексов с белками Jun, повышая их ДНК-связывающую активность. Различные белки семейств имеют разный потенциал трансактивации. JUN, FOS и FOSB считаются сильными активаторами, а JUNB, JUND, FRA1 и FRA2 – слабыми. Будучи слабыми активаторами, JUNB, JUND, FRA1 и FRA2, образуя малоактивные димеры с JUN, FOS и FOSB, могут выступать в качестве негативных регуляторов активности AP-1 (Hess J. et al., 2004). Состав димеров оказывает очень большое влияние на регуляторные функции комплекса. Например, показано, что образование димеров FOS:JUN

повышает трансформирующую активность JUN, в то же время образование димеров JUN:JUNB ее ингибирует. Различия могут объясняться более высокой ДНК-связывающей активностью гетеродимеров (Eckert R.L. et al., 2013).

Экспрессия самих членов семейства регулируется ростовыми факторами, цитокинами, хемокинами, гормонами и различными воздействиями внешней среды. В регуляции активности AP-1 участвуют G-белки, адаптерные белки, MAP киназы и другие компоненты внутриклеточных регуляторных систем (Sobolev V.V. et al., 2010). Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) - это система киназ, осуществляющая сигнальную трансдукцию в клетке. Они отвечают на различные формы физического и химического стресса, которым подвергаются клетки, и участвуют в различных клеточных процессах, например, в росте и движении клеток, их дифференцировке и гибели (Wancket L.M. et al., 2012). Передача сигнала по каскаду осуществляется за счет серии фосфорилирований киназ более низкого уровня киназами более высокого уровня. Три подсемейства МАРК хорошо охарактеризованы у млекопитающих: внеклеточные сигнал-регулируемые киназы ERKs, JUN N-терминальные киназы JNK и p38 митоген-активируемые протеинкиназы МАРК. Судьба клетки зависит от того, какой из МАРК сигнальных каскадов активирован: ERK в основном регулируют клеточный рост и дифференцировку, в то время как JNK и p38 МАРК регулируют ответы на стресс. Фосфорилирование киназ приводит к их активации и перемещению из цитоплазмы в ядро клетки, где через фосфорилирование транскрипционных факторов, коактиваторов и нуклеосомных белков изменяют экспрессию генов. AP-1 регулируется на нескольких уровнях: на уровне экспрессии, в процессе димеризации в зависимости от белков, образующих димеры, путем пост-трансляционных модификаций, например, фосфорилирования (белки AP-1 фосфорилируются киназами каскада МАРК) (Riehl A. et al., 2009). Кроме того, срок жизни белков AP-1 регулируется путем их убиквитинирования и последующей протеасомной деградации. В кератиноцитах белки AP-1 являются основными мишенями МАРК-киназного сигнального

каскада, и контролируют пролиферацию, дифференцировку и апоптоз этих клеток. Наиболее активными регуляторами в эпидермисе выступают JUNB, JUND и FRA1 (Eckert R.L. et al., 2013).

На сегодняшний день накоплено большое количество данных о роли редокс-чувствительных транскрипционных факторов, таких, как NF-κB и AP-1, в регуляции воспаления (Рисунок 5).

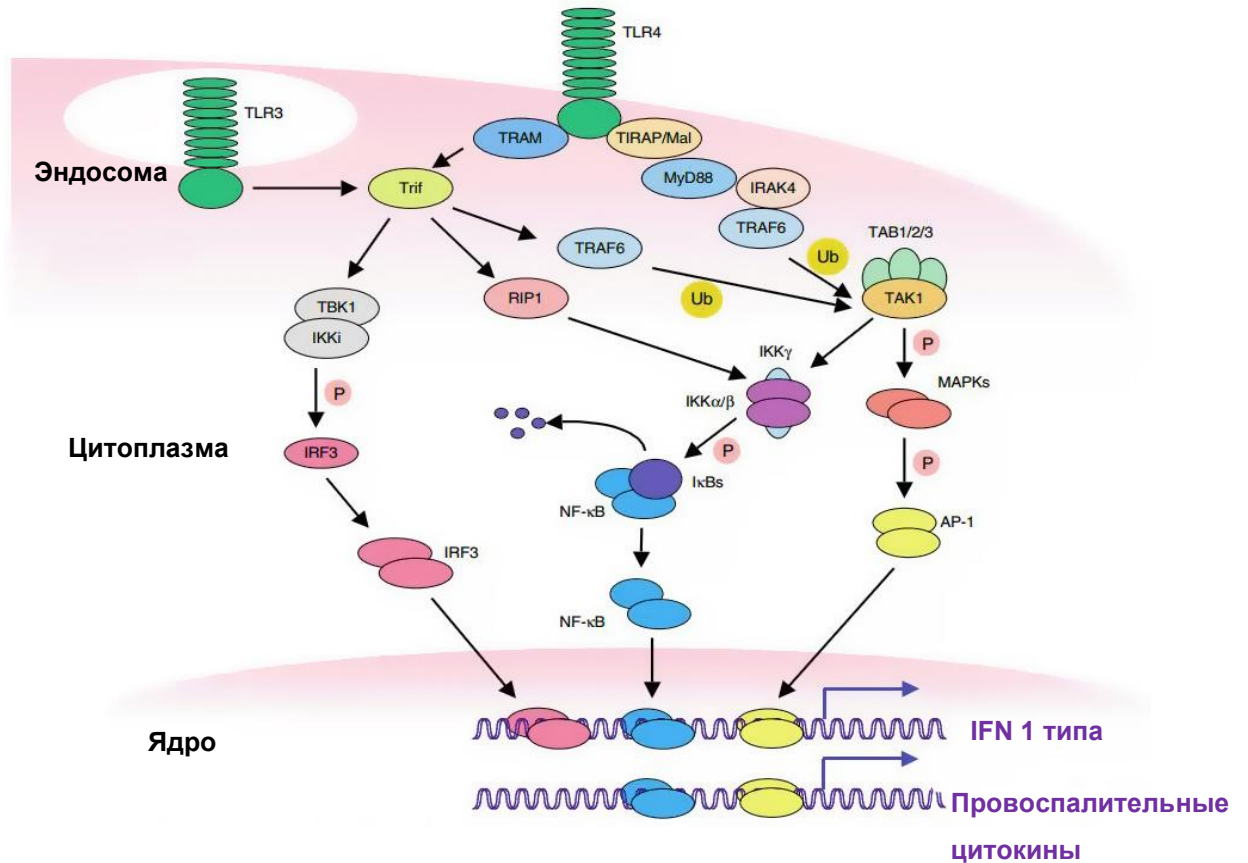


Рисунок 5. Развитие воспаления, опосредованное активацией рецепторов TLR3- и TLR4- под воздействием двунигетовой РНК и липополисахаридов грамотрицательных бактерий, соответственно. TLR3- и TLR4-опосредованные сигнальные каскады приводят к активации транскрипционных факторов IRF3, NF-κB и AP-1 (Kawai T. et al., 2007).

Развитие воспаления связано с повышением продукции комплемента, цитокинов, хемокинов, провоспалительных медиаторов (гистамина, простагландина E₂, оксида азота (NO) и активных форм кислорода) и адгезионных молекул. Продукция цитокинов и хемокинов находится под регуляцией вышеупомянутых транскрипционных факторов (Schonthaler H.V. et al., 2011). При возникновении aberrантной активации транскрипционных факторов наблюдается

развитие устойчивого хронического воспаления, что приводит к таким серьезным заболеваниям, как рак, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, псориаз и ревматоидный артрит (Yang W.S. et al., 2013).

1.3.2. Семейство JUN

Наиболее изученным членом семейства является белок JUN. Протоонкоген *jun* впервые был выделен из вируса саркомы птиц в 1987 году (Maki Y. et al., 1987). Данный белок имеет ядерную локализацию, ген экспрессируется в различных клетках на базальном уровне, а под действием ростовых факторов, цитокинов и ультрафиолетовой радиации его экспрессия повышается. Регуляторная активность осуществляется через повышение экспрессии позитивных регуляторов клеточного цикла. JUN активирует пролиферацию кератиноцитов, гепатоцитов и фибробластов (Hess J. et al., 2004).

Было показано, что белки семейства JUN имеют противовоспалительную активность (Guinea-Viniegra J. et al., 2009). Индуцибельная делеция *JunB* и *c-Jun* в эпидермисе взрослых мышей приводила к развитию псориазоподобного фенотипа. У человека потеря или снижение экспрессии *JUN* в эпидермисе снимает блокировку продукции цитокинов и может приводить к развитию системной красной волчанки (Schonthaler H.V. et al., 2011).

Что касается других членов семейства JUN, JUNB имеет сходную с JUN первичную структуру, однако, лишен трансактивационного домена, содержащего N-терминальные сериновые остатки 63 и 73, необходимые для MAPK-зависимого фосфорилирования и соответствующей активации. Киназа JNK фосфорилирует треонины 102 и 104, частично компенсируя отсутствие трансактивационного домена (Das K.C. et al., 2010). Тем не менее, JUNB в клетке выступает как более слабый активатор и в целом может служить ингибитором AP-1, образуя малоактивные димеры с белком JUN (Hess J. et al., 2004).

Белок JUND также имеет сходную с JUN первичную структуру и несет аналогичные сайты связывания и фосфорилирования. Как и другие белки

семейства, он является регулятором клеточного роста, дифференцировки, выживания и апоптоза. Кроме того, он защищает клетки от окислительного стресса, регулируя экспрессию генов каскадов антиоксидантной защиты и продукции активных форм кислорода. У мышей, нокаутированных по гену *JunD*, наблюдались ранняя дисфункция эндотелия и старение сосудов, связанные с повышенным образованием активных форм кислорода (Paneni F. et al., 2013). JUND является протоонкогеном, напрямую взаимодействуя с белком менином, продуктом опухолевого супрессора *MEN1* (Wu T. et al., 2011). Кроме того, образуя гетеродимеры с FRA2, JUND участвует в развитии кожной Т-клеточной лимфомы и Т-клеточного лейкоза взрослых (Nakayama T. et al., 2012).

1.3.3. Семейство FOS: FOS, FOSB, FRA2

Семейство белков FOS представлено четырьмя членами: FOS, FOSB, FRA1 и FRA2. Так же, как и белки семейства JUN, белки семейства FOS несут гидрофобную область bZIP, которая опосредует белок-белковые взаимодействия, и основной домен, который отвечает за связывание с ДНК. В С-терминальной области FOS и FOSB расположен трансактивационный домен, который отсутствует у FRA1 и FRA2. Белки семейства очень нестабильны: в отличие от большинства регуляторов клеточного цикла, они могут быть деградированы без убиквитинирования. Компьютерный анализ показал, что аналогичные мотивы отсутствуют у других белков клетки и, вероятно, являются характерной особенностью белков данного семейства (Gomard T. et al., 2008).

Белок FOS участвует в регуляции молекулярных механизмов клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза и трансформации. Анализ генетически модифицированных мышей и клеточных линий указал на важную роль этого белка в развитии, поддержании гомеостаза тканей и в клеточном ответе на воздействия окружающей среды. FOS может являться негативным регулятором воспаления, ингибируя активность NF-κB (Ray N. et al., 2006). Результаты тестирования ингибиторных малых молекул на мышинных моделях

воспалительных заболеваний, например, артрита и острой почечной недостаточности, говорят о важной роли данного белка в регуляции развития воспаления (Durchdewald M. et al., 2009, Miyazaki H. et al., 2012). Нарушения функционирования FOS связывают с развитием иммунологических, скелетных и неврологических отклонений, а также онкогенной трансформацией и развитием опухолей. Роль FOS в развитии разных типов опухолей различна – имеются публикации, описывающие как противоопухолевую активность данного белка, так и его протоонкогенную активность (Tulchinsky E., 2000, Milde-Langosch K. et al., 2004, Durchdewald M. et al., 2009).

Экспрессия *FOSB*, аналогично *FOS*, увеличивается в ответ на различные митогены. *FOSB* образует комплекс с белками JUN, JUNB и JUND, и является сильным транскрипционным активатором. Как и FOS, *FOSB* является регулятором жизненного цикла клетки и зачастую может компенсировать функции этого белка у нокаутных по *FOS* животных. В отличие от FOS, *FOSB* в комплексе с JUN вызывает Fas/FasL-опосредованный апоптоз клеток (Hess J. et al., 2004). Тем не менее, *FOSB* может оказывать стимулирующее воздействие на образование опухолей (Milde-Langosch K. et al., 2004).

Два других члена семейства FOS, *FRA1* и *FRA2*, несмотря на слабый потенциал активации транскрипции, играют важную роль в опухолеобразовании, и широко представлены в *ras*- и *src*-трансформированных фибробластах мышей и цыплят, а также в неопластических клетках щитовидной железы и клетках злокачественной аденокарциномы мышей (Tulchinsky E., 2000). Для *FRA2* характерен отличный от других генов семейства профиль экспрессии, указывающий на важную роль данного белка в развитии зародыша. Как уже было сказано, *FRA2* играет важную роль в опухолеобразовании (Nakayama T. et al., 2012), и высокий уровень экспрессии *Fra-2* связан с высокой частотой рецидивов опухолей молочной железы (Milde-Langosch K. et al., 2004).

1.4. FRA1, его основные характеристики

Ген, кодирующий белок FRA1 (также обозначаемый как FOSL1, FOS-like antigen 1), состоит из 8305 нуклеотидов и располагается на длинном плече 11-й хромосомы (позиция 11q13). Белок FRA1 состоит из 271 аминокислоты и имеет массу 29,413 kDa. Белок содержит сигнал ядерной локализации, его основная масса в клетке содержится в ядре, однако, в условиях окислительного стресса и при раковых заболеваниях может присутствовать в цитоплазме клеток (Burch P.M. et al., 2004). Как и другие белки семейства, FRA1 содержит ДНК-связывающий домен, домен «лейциновой молнии» bZip (Рисунок 6), гомологичный доменам «лейциновой молнии» других генов семейства FOS, однако, в нем отсутствует сильный трансактивационный мотив, присутствующий в С-терминальной области С-FOS и FOSB (Funk M. et al., 1997). Именно этот мотив напрямую задействован в транскрипционной активации генов-мишеней белками семейства.

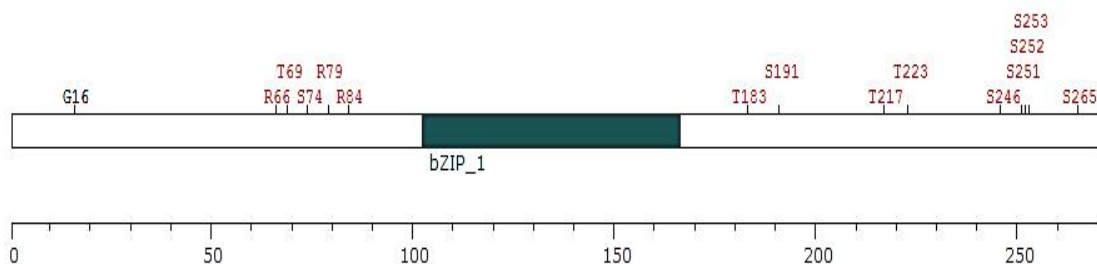


Рисунок 6. Схема расположения сайтов фосфорилирования FRA1 (база данных PhosphoSitePlus®, <http://www.phosphosite.org>).

Исходя из вышесказанного, FRA1 долгое время считался негативным регулятором активности AP-1, поскольку димеры, содержащие данный белок, имеют более низкий потенциал трансактивации, нежели комплексы, содержащие С-FOS или FOSB. Однако, позже было выяснено, что FRA1 несет второй, более слабый N-концевой трансактивационный домен, поэтому он все же может выступать в качестве активатора транскрипции при высоком уровне экспрессии гена (Funk M. et al., 1997). Позже было показано, что для функционирования в качестве активатора транскрипции необходимо его фосфорилирование по Thr231, осуществляемое киназой ERK. Помимо киназы ERK, фосфорилирование FRA1

осуществляется и другими киназами, например, протеинкиназами C, A и циклин-зависимой киназой 2 (Young M.R. et al., 2006). Однако, именно фосфорилирование киназой ERK необходимо для защиты новосинтезированного белка FRA1 от протеолиза. Интересно, что регуляцию экспрессии самого *FRA1* могут осуществлять различные члены AP-1. В промоторной области FRA1 присутствует цис-элемент, с которым могут связываться белки C-JUN, JUND и FRA2, повышая экспрессию FRA1 (Adisheshaiah P. et al., 2003).

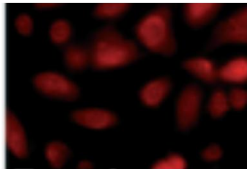
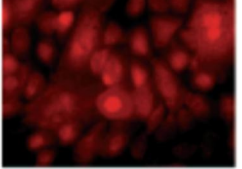
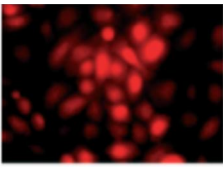
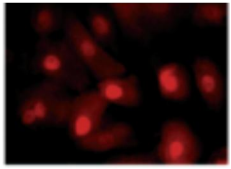
В норме FRA1 экспрессируется в зрелых органах и тканях на низком уровне, однако, его экспрессия может повышаться в ответ на воздействие митогенов, провоспалительных цитокинов, токсинов и патогенов. Из литературных данных известно о важной роли FRA1 в развитии зародыша, в клеточной дифференцировке, онкогенной трансформации, развитии воспаления (Young M.R. et al., 2006, Sobolev V.V. et al., 2011).

FRA1, как транскрипционный фактор, регулирует экспрессию генов, участвующих в делении клеток, в воспалительных процессах в организме, перестройке органов и тканей. К его мишеням относятся гены *CDKN2A*, *ELN*, *IL6*, *MMP1*, *MMP9*, *NQO1*, *PLAUR*, *VIP*, *Ccna2*, *Ccnd1*, *Cd44* (база данных Transcription Factor Encyclopedia, www.cisreg.ca).

Белок FRA1 имеет специфические функции в процессах развития зародыша и органогенеза. Нокаутные по *Fral* зародыши мыши гибли примерно на 10-й день развития из-за нарушений васкуляризации плаценты и желточного мешка. При инъекции клеток *Fral*^{-/-} в тетраплоидные бластоциты дикого типа были получены детеныши без нарушений роста, которые выживали до двух дней после рождения. Эффекты нокаута по *Fral* были сходны с полученными от нокаута по *JunB*, что говорит о сходных функциях этих белков в процессе развития зародыша (Jochum W. et al., 2001). Кроме того, трансгенные мыши со сверхэкспрессией *Fral*, имели изменения в фенотипе костей, усиленное образование костей, а также остеосклероз всего скелета (Jochum W. et al., 2001).

В коже накопление белка FRA1 зависит от стадии дифференцировки клеток (Таблица 1) (Mehic D. et al., 2005). Временной рисунок накопления белка дает основания предположить, что FRA1 может играть важную роль в гомеостазе уже дифференцированного эпидермиса (Рисунок 7).

Таблица 1. Накопление FRA1 в культуре кератиноцитов человека (NHEK).

Временные точки	до образования монослоя (OM)	1 день после OM	4 дня после OM	6 дня после OM
Рисунок экспрессии				

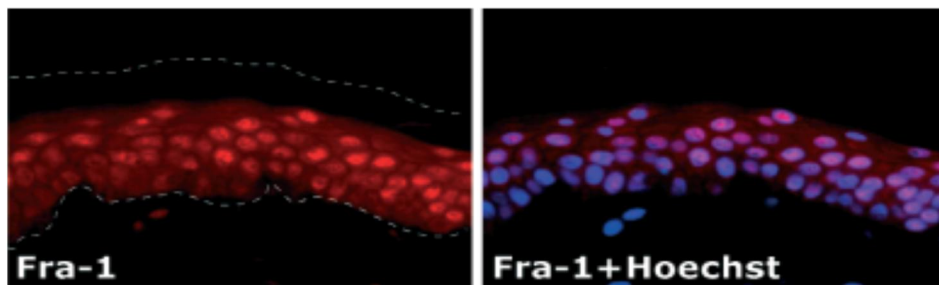


Рисунок 7. Иммунологическое окрашивание FRA1 и Hoechst в эпидермисе человека. Пунктиром обозначены границы эпидермиса (Mehic D. et al., 2005).

Подтверждением гипотезы об участии FRA1 в процессе терминальной дифференцировки кератиноцитов и поддержании гомеостаза дифференцированного эпидермиса является показанное изменение уровня мРНК и белка в кератиноцитах при их обработке сульфатом холестерина. Этот эндогенный липид, продуцируемый верхними слоями эпидермиса во время их терминальной дифференцировки, играет важную роль в регуляции дифференцировки кератиноцитов. Было выдвинуто предположение, что регуляторные функции данного липида могут осуществляться именно через изменение продукции белка FRA1 (Hanley K. et al., 2001).

Следующим шагом в выяснении роли FRA1 в эпидермисе стало исследование, показавшее, что экспрессия гена инволюкрин *IVL* регулируется белками JUNB, FRA1 и FRA2 (Adhikary G. et al., 2004). Инволюкрин является

одним из белков рогового слоя эпидермиса, и его накопление связывают с терминальной дифференцировкой кератиноцитов.

Помимо регуляции дифференцировки клеток кожи, FRA1 может участвовать в регуляции ее васкуляризации. В опытах по пересадке кожи на мышах идентифицировали повышение накопления этого белка в кератиноцитах трансплантата после пересадки. Исследования *in vitro*, проведенные на линии кератиноцитов человека HaCaT, показали, что эпидермальный фактор роста (EGF) является сильным активатором экспрессии генов *FRA1* и *VEGF* в кератиноцитах. EGF-индуцированное накопление FRA1 происходило параллельно с накоплением VEGF, при этом в нокаутированных по FRA1 кератиноцитах накопления VEGF не наблюдалось. Поскольку *VEGF* несет сайты посадки AP-1 в промоторной области, вероятно, белок FRA1 является его регулятором (Seitz O. et al., 2012).

Что касается онкогенных характеристик данного белка, онкогенность FRA1 значительно ниже, чем у FOS. Тем не менее, при некоторых типах опухолей наблюдается гиперпродукция FRA1, и зачастую накопление этого белка связано с плохим прогнозом для больного (Jochum W. et al., 2001, Motrich R.D. et al., 2013). В качестве примера можно привести исследование, в котором было показано, что сверхэкспрессия FRA1 сильно увеличивала рост и инвазивный потенциал эпителиальных клеток легких (Adisheshaiah P. et al., 2007). Несмотря на то, что в большинстве работ ген *FRA1* рассматривается как протоонкоген, показано, что при некоторых типах рака белок FRA1 может выступать как супрессор опухолевой активности (Milde-Langosch K., 2005).

В целом, можно констатировать, что FRA1 задействован в регуляции экспрессии генов в норме и при патологии, он играет важную роль в развитии и поддержании гомеостаза различных систем организма. Изучение активности данного белка в регуляции процессов воспаления является потенциально значимым для составления полной картины развития воспалительных заболеваний и разработки новых подходов к их лечению.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Биологический материал

В настоящей работе были собраны 42 пары биопсий больных псориазом, из которых прошли контроль качества РНК и были использованы в работе 37 пар (выборка 1 – 14 пар, проведение полногеномного секвенирования транскриптома; выборка 2 – 13 пар, оценка экспрессии генов семейства AP-1; выборка 3 – 10 пар, оценка экспрессии *FRA1*, 5 из 10 пар использованы для приготовления иммуногистохимических препаратов). Все больные подписывали информированное добровольное согласие. Исследование было одобрено Локальным комитетом по этике при Институте общей генетики РАН и соответствует принципам, изложенным в декларации Хельсинкского соглашения.

Забор биоптатов кожи больных псориазом *Psoriasis vulgaris* (бляшечного типа) из пораженного и визуально непораженного участков кожи проводили под местной анестезией с помощью дерматологического пробойника (4 мм²). Пациенты не получали какой-либо системной или PUVA/UV терапии в течение одного месяца до биопсии. Биопсии визуально непораженной кожи для сравнительного анализа забирали на расстоянии минимум 3–4 см от центра очага поражения, таким образом, чтобы область забора не имела визуальных псориазоподобных изменений. Образцы быстро замораживали в жидком азоте вплоть до определения биохимических параметров, время от начала процедуры забора биоптатов до замораживания не превышало 45 секунд.

2.2. Ферменты и реактивы

Для проведения экспериментов были использованы ферменты и реактивы компаний Sigma, Fermetas, Promega, Zymo Research, Merck, ICN Biomedicals, Inc. Invitrogen, Life Technologies, QIAGEN, Millipore, Peprotech, Панэко, Евроген и других. Использовался пластик для культивирования клеток фирм Greiner, Corning и Costar.

2.3. Клеточные линии и штаммы

В работе был использован штамм бактерий *E.coli* XL₁Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZdeltaM15 Tn10(TetR)]), линии клеток человека HEK-293T (иммортилизованная линия эпителиальных клеток почки человека), и HaCaT (спонтанно иммортилизованная линия кератиноцитов человека).

2.4. Выделение РНК из кожи с применением реактива Trizol

Нижеописанный протокол применяли при выделении РНК из биопсий кожи для приготовления библиотек для полногеномного секвенирования транскриптома.

1. Взятые пробы переносили в микропробирки объемом 2 мл. Затем к пробам добавляли 1 мл реактива Trizol (Invitrogen) и измельчали на лабораторном гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN) при помощи металлических шариков (максимальная амплитуда, 10-15 мин, до полной гомогенизации образца).
2. Гомогенат центрифугировали 3 мин при 13 тыс. об., RT.
3. К супернатанту добавляли хлороформ из расчета 0,2 ml хлороформа на 1 ml Trizol, перемешивали встряхиванием в руках в течении 15 сек, инкубировали 3 мин RT.
4. Центрифугировали образцы на 13 тыс. об., 15 мин, 4°C.
5. Отбирали надосадочную жидкость в новую пробирку (без отбора интерфазы), добавляли изопропанол из расчета 0,5 мл изопропанола на 1 мл Trizol, инкубировали 10 мин RT.
6. Центрифугировали образцы на 13 тыс.об., 10 мин, 4°C.
7. Отбирали изопропанол, осадок отмывали 75% этанолом, центрифугировали образцы на 13 тыс.об., 5 мин, RT.
8. Осадок высушивали (5-10 мин, RT), растворяли в воде без РНКаз.

Дальнейшая обработка полученной РНК и приготовление библиотек для полногеномного секвенирования транскриптома описаны в п. 2.15 данного раздела.

2.5. Выделение РНК из кожи на колонках

Взятые пробы переносили в микропробирки объемом 2 мл. Затем к пробам добавляли 300 мкл буфера RLT (QIAGEN) с бета-меркаптоэтанолом (0,1%) и измельчали на лабораторном гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN) при помощи металлических шариков (максимальная амплитуда, 10-15 мин, до полной гомогенизации образца).

РНК из гомогената выделяли при помощи наборов RNeasy mini kit (QIAGEN) по протоколу производителя:

1. К гомогенату добавляли 590 мкл ddH₂O и 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл, AppliChem) и перемешивали пипетированием. Инкубировали 10 мин при 55°C.
2. Центрифугировали 3 мин при 13 тыс. об. при комнатной температуре.
3. Супернатант (около 900 мкл) переносили в новую пробирку, добавляли половину объема (около 450 мкл) этанола 96%, перемешивали образец.
4. Переносили 700 мкл образца, включая преципитат, на RNeasy mini колонку, центрифугировали 15 сек при более 8000g (10 тыс.об/мин).
5. Удаляли жидкость из пробирки и повторяли предыдущий этап.
6. Колонку промывали 350 мкл буфера RW1, после чего обрабатывали ДНКазой (DNaseI, QIAGEN). Для этого добавляли 10 мкл исходного раствора DNaseI с 70 мкл буфера RDD на колонку и оставляли на 15 мин RT.
7. Колонку промывали 350 мкл буфера RW и дважды 500 мкл буфера RPE.
8. РНК смывали 50 мкл H₂O без РНКаз.

Кол-во РНК определяли на флуориметре Qubit с набором RNA BR Assay Kit (Life Technologies). Качество выделенной РНК проверяли при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашивание EtBR, напряжение 10 В/см между электродами. Данный протокол применяли при выделении РНК из биопсий кожи и из клеток для последующего анализа экспрессии генов при помощи количественной ПЦР в реальном времени.

2.6. Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора MMLV RT kit (Евроген) по протоколу производителя:

1. В пробирки для ПЦР объемом 200 мкл вносили: 1 мкл 50мкМ олиго(dT)₂₀-праймеров (ДНК-Синтез), 12 мкл РНК-матрицы (концентрация 50-250 нг/мкл).
2. Смесь нагревали до 70°C 2 мин, затем охлаждали на льду 1 мин.
3. В пробирки добавляли: 4 мкл 5X буфера, 2мкл 10мМ смеси dNTP, 2 мкл 20мМ DTT, 1-2 мкл ревертазы MMLV (100- 200 ед.).
4. Смесь тщательно пипетировали, затем инкубировали 1 час при 37°C.
5. Реакцию останавливали путем прогревания смеси на 70°C в течение 15 мин.

2.7. Количественная ПЦР в реальном времени

Дизайн праймеров и проб проводили к последовательностям генов, взятым из базы данных Gene Национального центра биотехнологической информации (NCBI gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Праймеры к мРНК генов подбирали с помощью программ "Beacon Designer 7". При отработке условий ПЦР в качестве матрицы использовали кДНК, полученную методом обратной транскрипции с выделенной тотальной РНК из клеток кожи (кератиноцитов и фибробластов) человека.

ПЦР в реальном времени проводили в 96-ти луночных оптических планшетах с использованием меченных флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб. Реакцию проводили с использованием 5-кратной реакционной смеси с референсным красителем ROX qPCRmix-HS ROX (Евроген, Россия). Праймеры и пробы были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез». При оценке экспрессии генов семейства AP-1 (выборка 2) амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (BioRad, iQ4), используя следующую программу: 1) денатурация при 95°C в течение 4 мин, 2) денатурация при 94°C в течение 15 сек, 3) отжиг при 55°C в течение 15 сек, 4) элонгация при 72°C в течение 15 сек, 5) этапы 2-4 повторяли 50раз. При оценке экспрессии гена *FRA1* (выборка 3) и при

сверхэкспрессии и ингибировании *FRA1* амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (Eco, Illumina), используя программу Two-step (первичная денатурация при 95°C течение 4мин, затем 45 циклов: денатурация при 94°C в течение 15 сек, отжиг+элонгация при 60°C в течение 30сек, 45 циклов).

Уровень экспрессии генов-мишеней нормировали относительно содержания мРНК гена “домашнего хозяйства” *GAPDH*. Амплификацию гена *GAPDH* и исследуемых генов проводили в разных пробирках.

Синтез праймеров и проб осуществлялся компанией «ДНК-Синтез». Последовательности праймеров (F – прямой праймер, R – обратный праймер) и проб, использованных в работе, перечислены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности праймеров и проб, использованных при проведении количественных ПЦР в реальном времени.

Ген	Последовательность праймеров	Последовательность пробы
<i>FOS</i>	F = AGTGACCGTGCTCCTACC R = CATCATCGTGGCGGTTAGG	FAM- CGCGATCGGGCGGAGACAGGT GGGCGGATCGCG-BHQ1
<i>JUN</i>	F = ACTGAGTGTGGCTGAAGC R = CTGGGCAGTTAGAGAGAAGG	FAM- CGCGATCCTGGCTGGCTGGCT GTGTCTGTGATCGCG-BHQ1
<i>JUND</i>	F = AGCTCACAGTTCCTCTACCC R=GCTGGTTCTGCTTGTGTAATC	FAM- CGCGATCCCTCGGCGAACTCCT GCTCCTGATCGCG-BHQ1
<i>JUNB</i>	F = AATGGAACAGCCCTTCTACC R = GGTTTCAGGAGTTTGTAGTCG	FAM- CGCGATCCACAGCTACGGGAT ACG GCCGATCGCG-BHQ1
<i>FOSB</i>	F =CCACCAGCGGAACTACCAGTG R = GCCTGGAGTCGGTCGGTCAG	FAM- AGAGGAGACGCTACCCCAGA GGAA-BHQ1
<i>FRA1</i>	F = CACCCTAGCCAATGTCTCC R = CACCCTAGCCAATGTCTCC	FAM- CGCGATCAGAAGAAGTTGCTG GAGTTGGATGTGGGATCGCG- BHQ1
<i>FRA2</i>	F = CATTTCATCCCCACCATCAACG R = GTGCGAGCGAGGGTATGG	FAM- CGCGATCGATCACTGTGGGCT GCACCATCCAGATCGCG-BHQ1
<i>MMP1</i>	F=CGGTTTTTCAAAGGGAATAAGTACT R =TCAGAAAGAGCAGCATCGATATG	FAM- AATGTGCTACACGGATACCC AAGGACA-BHQ1
<i>MMP2</i>	F = CGCTCAGATCCGTGGTGAG R = TGTCACGTGGCGTCACAGT	FAM- TTCTTCTTCAAGGACCGGTTCA TTTGG-BHQ1

<i>MMP9</i>	F = ACCTCGAACTTTGACAGCGAC R = GAGGAATGATCTAAGCCCAGC	FAM- TGCCCGGACCAAGGATACAGT TTGTT-BHQ1
<i>MMP12</i>	F = TCGCCTCTCTGCTGATGACAT R = GTCAGGATTTGGCAAGCGTT	FAM- CATTTCAGTCCCTGTATGGAGAC CCAA-BHQ1
<i>CCL22</i>	F = CCTTGCTGTGGCGCTTCA R = GGCAGACGGTAACGGACGT	FAM- CAACTGAGGCAGGCCCTACG G-BHQ1
<i>PLAUR</i>	F = TGTGCAACCAGGGCAACTCT R = CCCTCTCACAGCTCATGTCTGAT	FAM- CACCTATTCCTCGAAGCCGTTAC CTC-BHQ1
<i>CCNA2</i>	F = CCTGGCTTTTAATTCAGCCATT R = GTCCATAGTATGTGGTGA CTCAA AAC	FAM- TACCTGGACCCAGAAAACCAT TGGTC-BHQ1
<i>HMOX1</i>	F = GAACTTTCAGAAGGGCCAGGT R = CGCTCAATCTCCTCCTCCAG	FAM- CCGAGACGGCTTCAAGCTGGT GAT-BHQ1
<i>MGP</i>	F = CCTCAGCAGAGATGGAGAGCTAA R = CAAAGTCTGTAGTCATCACAGGCTT	FAM- TCCAAGAGAGGATCCGAGAAC GCTC-BHQ1
<i>GAPDH</i>	набор компании ДНК-Синтез “GAPDH human”	

2.8. Культивирование клеточных линий

Все работы с культурой клеток проводили в стерильном ламинарном боксе согласно общепринятым правилам работы в лаборатории 2-го класса биобезопасности. Культивирование клеток линий HaCaT (иммортиализованные кератиноциты человека) и HEK-293T (иммортиализованная линия эпителиальных клеток почки человека) проводили по стандартным методикам с модификациями. Клетки рассеивали с плотностью 25 тыс. клеток на 1 см² и растили в питательной среде DMEM (Панэко), дополненной 10% FBS (Gibco) и 0.1% L-глутамином (Панэко) в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и 37°C. По достижении монослоя клетки пересевали.

Клетки линии HaCaT пересевали следующим образом: отбирали питательную среду и промывали 0,125% р-ром трипсина (Панэко), затем инкубировали в трипсине 10-15 мин при 37°C до открепления основной массы клеток от пластика. Клеточную суспензию отбирали и центрифугировали 3 мин при 1,2 тыс.об. Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM,

подсчитывали количество клеток в камере Горяева и рассеивали на культуральные чашки.

Пересев клеток линии НЕК-293Т проводили по упрощенной процедуре без обработки трипсином: клетки смывали с пластика питательной средой. Остальные процедуры те же, что и для клеток линии HaCaT.

2.9. Создание конструкций для гиперэкспрессии *FRA1*

Методом полимеразной цепной реакции с высокоточной и специфичной ДНК-полимеразой Tersus (Евроген) на матрице вектора p6599_MSCV_IP_N_HAonly_FOSL1 (Addgene Plasmid #34897) была амплифицирована кДНК гена *FRA1*. Для реакции использовались синтезированные праймеры с сайтами рестрикции для последующего лигирования целевых фрагментов в экспрессионные векторы.

Последовательности праймеров, использованных для клонирования:

hFOSL1_fwd_EcoRI GAATTCATGTTCCGAGACTTCGG;

hFOSL1_rev_EcoRI GAATTCTCACAAAGCGAGGAGGG;

Полученные фрагменты лигировали в Т-вектор (pX) при помощи T4 ДНК-лигазы (Fermentas) по протоколу производителя и осуществляли трансформацию компетентных клеток *E.coli* (штамм XL₁blue) лигазной смесью. Приготовление компетентных клеток проводили химическим методом с помощью обработки CaCl₂ по стандартному протоколу (Sambrook J. et al., 2001). Трансформацию осуществляли методом теплового шока при 42°C по стандартному протоколу (Sambrook J. et al., 2001), затем трансформированные клетки рассеивали на агаризованную среду LB с селективным антибиотиком ампициллином. Чашки инкубировали в термостате при 37°C 12 часов, затем проводили ПЦР для проверки на вставку последовательности кДНК гена *FRA1* с визуализацией продуктов реакции в агарозном геле (1%).

С идентифицированных колоний, несущих вставку, ставили наработку бактериальной культуры (среда LB, ампициллин, 37°C, 12 часов), затем выделяли

плазмиду со вставкой целевого гена (pX_FRA1) методом щелочного экспресс-лизиса по следующему протоколу:

1. 3 мл бактериальной культуры осаждали центрифугированием 13 тыс.об. 30 сек.
2. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора 1 (50мМ глюкоза, 25 мМ Tris-HCl pH 8.0, 20 мМ EDTA), перемешивали на шейкере Vortex (Biosan), инкубировали 5 мин.
3. Добавляли 400 мкл раствора 2 (NaOH 0.2M, SDS 1%), перемешивали переворачиванием, инкубировали 5 мин на 4°C.
4. Добавляли 360 мкл холодного 10M AcONH₄, перемешивали переворачиванием, инкубировали 5 мин на 4°C.
5. Добавляли 150 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), центрифугировали 10 мин. 13 тыс.об. RT.
6. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 600 мкл изопропанола, центрифугировали 8 мин. 13 тыс.об. RT.
7. Промывали осадок 80% этанола, центрифугировали 10 мин. 13 тыс.об. RT.
8. Супернатант удаляли, осадок подсушивали 5 мин 37°C, растворяли в 50 мкл H₂O.

Осуществляли рестрикцию плазмиды pX_FRA1 рестриктазой EcoRI (Fermentas) (37°C, 1 час, по протоколу производителя), затем наносили реакционную смесь на агарозный гель (1%) и выделяли целевые фрагменты (кДНК гена *FRA1*, фланкированная сайтами рестрикции) из геля по стандартному протоколу при помощи Glassmilk (Sambrook J. et al., 2001).

Для создания экспрессионных конструкций для индуцибельной экспрессии в клетках млекопитающих осуществляли рестрикцию вектора FU-tet-o-hOct4 (Addgene Plasmid #19778) рестриктазой EcoRI (37°C, 1 час, по протоколу производителя) с обработкой щелочной фосфатазой (FastAP, Fermentas, 37°C, 10 мин, по протоколу производителя) и последующим нанесением реакционной смеси на агарозный гель (1%) и выделением целевых фрагментов

(линеаризованный вектор с удаленной последовательностью гена *hOct4*) из геля по стандартному протоколу при помощи Glassmilk (Sambrook J. et al., 2001).

Последовательность кДНК гена *FRA1*, фланкированную сайтами рестрикции, лигировали при помощи T4 ДНК-лигазы (Fermentas) в линеаризованный вектор по липким концам, образованным в результате проведенной рестрикции (схема конструкции приведена на рисунке 8). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* последующей проверкой ПЦР на ориентацию вставки. Ночную культуру с выбранных колоний, содержащих вставку в нужной ориентации, инкубировали в термостате при 37°C в течении 12 часов, затем выделяли плазмидную ДНК без эндотоксинов при помощи наборов Miniprep и Midiprep по протоколу производителя (Евроген). Концентрацию плазмидной ДНК измеряли на флуориметре Qubit (Life Technologies) с набором Qubit DNA BR Assay kit по протоколу производителя.

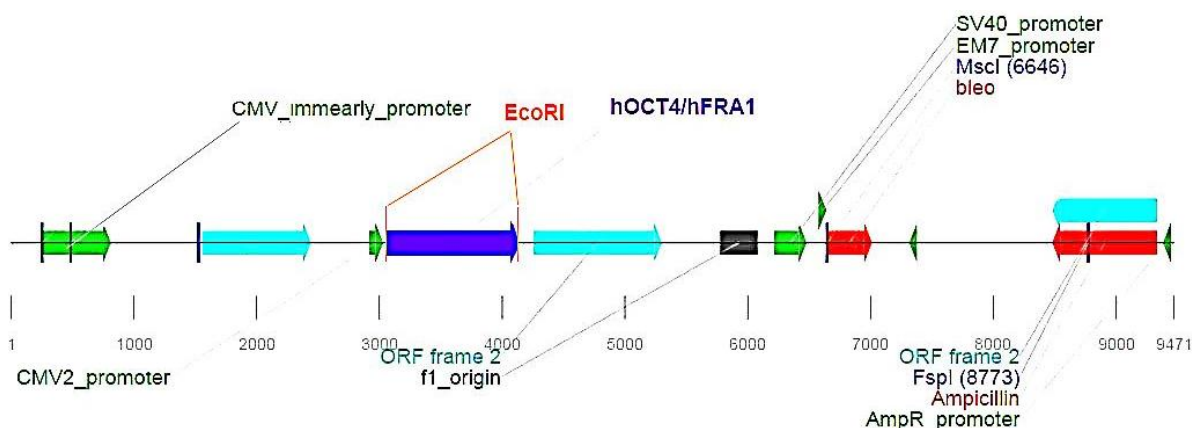


Рисунок 8. Схема создания вектора FU-tet-o-hFRA1 на основе вектора FU-tet-o-hOct4. Фиолетовым цветом выделена целевая последовательность (последовательность гена *OCT4*, которая была заменена на последовательность гена *FRA1*), оранжевым - сайты рестрикции фермента *EcoRI*, по которым осуществлялось клонирование.

2.10. Получение вирусных частиц для заражения клеток

Получение вирусных частиц осуществляли по модифицированному протоколу Tiscornia et. al. (Tiscornia G. et al., 2006) с применением трансфецирующего агента Metafectene Pro (Biontex).

День 1, рассев. Клетки линии НЕК-293Т рассевали на 100 мм культуральные чашки (примерно 2×10^6 клеток на чашку) на желатин в среде, содержащей: DMEM, 10% инактивированной (1 час на 60 С на водяной бане) эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Gibco), 2 mM глутамин, и 50 ед/мл антибиотик/антимикотик (Anti-anti, Gibco).

День 2, трансфекция. При достижении клетками плотности в 60-70% от монослоя их трансфецировали липидным агентом Metafectene Pro в пропорции 22 мкл липидного агента к 16 мкл смеси плазмидных ДНК на 100 мм чашку Петри.

Состав смеси плазмидных ДНК: 5 мкг вектора pRSV-Rev, 10 мкг вектора pMDLg/pRRE, 2 мкг вектора pCMV-VSV-G, 10 мкг FU-tet-o-hFRA1. Трансфецирующий агент растворяли в PBS (доводя до объема 100 мкл), плазмиды смешивали и растворяли в PBS (доводя до объема 100 мкл), затем аккуратно вводили смесь плазмид в раствор трансфецирующего агента, однократно пипетировали, инкубировали смесь 15-20 минут на комнатной температуре, затем аккуратно добавляли к клеткам Phoenix. Через 6-8 часов среду меняли на 6 мл свежей полной среды DMEM.

День 3, 4, 5, сбор вирусов: Раз в сутки собирали среду с клеток, и меняли ее на 6 мл новой среды. Отобранную среду центрифугировали 10 мин на 500g, супернатант фильтровали через 0.48 мкм фильтр, затем замораживали либо непосредственно использовали для заражения.

Для сборки вирусных частиц с индуцибельной модифицированной Tet-on Dox-системой (Urlinger S. et al., 2000) экспрессии *FRA1* (общая схема приведена на рисунке 9) с отбором трансформированных клеток осуществляли параллельное заражение клеток HaCaT вирусными частицами, несущими полученный вектор FU-tet-o-hFRA1, и частицами, несущими вектор FUDeltaGW-rtTA-IRES-puro, являющийся модификацией вектора FUDeltaGW-rtTA (Addgene Plasmid #19780), полученной в Лаборатории генетических основ клеточных технологий И.В.Честковым.

Tet - On

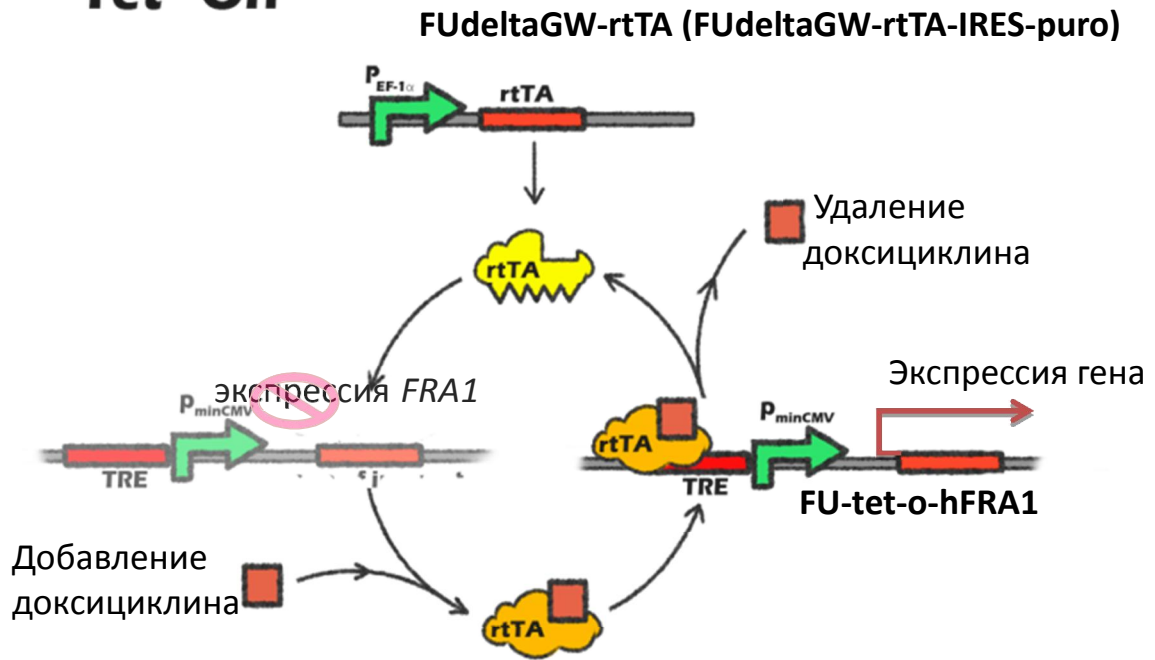


Рисунок 9. Общая схема индуцибельной модифицированной Tet-on Dox-системой экспрессии *FRA1* (модифицировано по <http://2013.igem.org/>).

Заражение проводили при соотношении MOI 2:2. Зараженные клетки культивировали на полной среде с антибиотиком пурамицином (Life Technologies, 0,8 мкг/мл) до достижения клетками полной конfluence, затем проводили 5-7 пассажей с рассевом до единичных колоний на среде с антибиотиком пурамицином (рассев 5-10 клеток/мл среды, содержащей 0,8 мкг/м на 24-луночные планшеты). Отбирали по 5 колоний и при помощи индукции доксициклин хлоридом с последующей оценкой экспрессии целевого гена методом qPCR выбирали колонии с наибольшим уровнем гиперэкспрессии целевого гена.

2.11. Индуцибельная сверхэкспрессия *FRA1*

Клетки линии HaCaT, экспрессировавшие *FRA1* в составе индуцибельной Tet-on Dox-системы, рассевали на чашки ($5 \cdot 10^5$ на 60 мм чашку) на стандартную среду с пурамицином (0,5 мкг/мл). На следующий день после посева проводили индукцию доксициклин гидрохлоридом (1 мкг/мл, Sigma). Клетки культивировали 48, 72 или 96 часов. В качестве контроля использовали трансформированные клетки без индукции доксициклином. Кроме того, для

моделирования псориазоподобного воспаления после индукции гиперэкспрессии *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, 50 нг/мл, IFN- γ , 10 нг/мл, TNF- α , 10 нг/мл). В качестве контроля в данном варианте опыта использовали клетки, обработанные цитокинами, без индукции доксициклином.

После проведения инкубации питательную среду отбирали и проводили лизис клеток буфером RLT (QIAGEN) с бета-меркаптоэтанолом (1%) для выделения РНК набором RNEasy QIAGEN (по протоколу производителя) и последующей оценки уровней экспрессии генов при помощи количественной ПЦР в реальном времени, либо проводили лизис буфером для образцов для электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях (TrisHCl 125 мМ рН 6.8, SDS 4%, глицерин 20%, бета-меркаптоэтанол 6М, бромфеноловый синий 0,01%), с ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific) для проведения Вестерн-блот гибридизации.

2.12. Вестерн-блот гибридизация

Общее количество белка в клеточных экстрактах определяли методом Бредфорд при помощи набора BioRad Protein Assay (BioRad) по протоколу производителя. Выровненные по концентрациям белка образцы денатурировали кипячением в течение 15 мин и вместе с маркером (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) наносили по 10 мкл на 12% полиакриламидный гель (4% концентрирующий гель и 12% разделяющий гель) для проведения белкового электрофореза в денатурирующих условиях. Условия электрофореза: постоянный вольтаж (200 Вольт), 50 мин. Для оценки электрофореза контрольные образцы геля окрашивали при помощи красителя Кумасси бриллиантовый синий.

Фракционированные белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher&Schuell) 50 Вольт, 1,5 часа. Применение окрашенного

маркера позволяло оценивать уровень переноса белков на мембрану. Для блокирования неспецифического связывания мембрану инкубировали в забивочном буфере с молоком (PBS, 0.1% Tween 20, 5% обезжиренного сухого молока, AppliChem) на орбитальном шейкере, 4°C, 12 часов.

Мембрану дважды промывали буфером TBST по 5 мин (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Обработку первичными антителами, разведенными до рабочих концентраций в соответствии с рекомендациями производителя (анти-FRA1 Novus Biologicals #NBP1-47757; анти-FRA1 Cell Signaling #5841; анти-β-Actin Cell Signaling #4970), проводили в течение 1 часа на орбитальном шейкере при комнатной температуре. Мембрану промывали буфером TBST, 3 раза по 5 мин. Обработку вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Life Technologies #65-6120), разведение 1:5000, проводили в течение 1 часа на орбитальном шейкере при 4°C. После этого мембрану дважды споласкивали буфером TBST и промывали дважды по 30 мин в буфере TBS+0.5% Triton-X100. Детекцию проводили при помощи набора ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) по протоколу производителя с последующей фотографической регистрацией.

2.13. Ингибирование экспрессии *FRA1* методом РНК-интерференции

Ингибирование экспрессии *FRA1* осуществляли при помощи РНК-интерференции. Доставку малых интерферирующих РНК в клетки осуществляли при помощи трансфекции липидным агентом Metafectene Pro (Biontex) по протоколу производителя. Оптимальные рабочие соотношения siRNA/липидный агент подбирали экспериментальным путем при помощи трансфекции клеток HaCaT контрольной siRNA, меченой флуоресцентной меткой. Эффективность трансфекции определяли визуально по следующей формуле:

$$E = \frac{\text{количество светящихся клеток в поле зрения}}{\text{общее количество клеток в поле зрения}} * 100\%$$

Оценку проводили визуально по 5 полям зрения микроскопа (Zeiss).

Для трансфекции клетки HaCaT рассеивали на 6-ти луночные планшеты ($2 \cdot 10^5$ на лунку), с тем, чтобы в день трансфекции плотность клеток составляла 60% от визуальной конfluентности. При трансфекции клетки культивировали в среде DMEM (Gibco) без сыворотки, трансфецирующий агент и siRNA смешивали в PBS (Gibco)

Для получения клеток с генетическим нокдауном *FRA1* применяли малые интерферирующие РНК (siRNA), подобранные в приложении BLOCK-iT™ RNAi Designer, направленные к кодирующим последовательностям гена. Были подобраны несколько последовательностей siRNA, которые затем оценивались по соответствию формальным требованиям к последовательностям эффективных siRNA, описанных в статье (Grinev V.V., 2012). Были выбраны 3 siRNA, максимально соответствовавших требованиям, которые были синтезированы (ДНК-Синтез) для дальнейшего анализа (Таблица 3).

Таблица 3. Использованные в работе малые интерферирующие РНК, направленные к кодирующим последовательностям гена *FRA1*.

Название	Последовательность
siRNA1-F siRNA1-R	GGAUGGUACAGCCUCAUUUdTdT AAAUGAGGCUGUACCAUCCdTdT
siRNA1-F siRNA1-R	GGAAGGAACUGACCGACUUdTdT AAGUCGGUCAGUCCUCCdTdT
siRNA1-F siRNA1-R	GGAGACUGACAAACUGGAAdTdT UCCAGUUUGUCAGUCUCCdTdT

Для создания рабочих конструкций прямые и обратные последовательности siRNA смешивали, доводили до концентрации 20 мкМ и прогревали 1 мин при 95°C с последующим плавным охлаждением до RT.

В качестве контроля при отборе siRNA использовалась обработка клеток трансфецирующим агентом. После инкубации в течении 48 часов при помощи qPCR оценивали эффективность ингибирования экспрессии *FRA1*.

После выбора целевой siRNA к ней была синтезирована контрольная последовательность “scrambled RNA”, которая состояла из тех же букв, расположенных в случайном порядке (Таблица 4).

Таблица 4. Последовательность “scrambled RNA”, использованной в работе.

Название	Последовательность
siRNA1ctrl-F	CUCAAGGAGUUCUGUUACGdTdT
siRNA1ctrl-R	CGUAACAGAACUCCUUGAGdTdT

Данная siRNA не оказывала значимого влияния на экспрессию гена *FRA1* или на морфологию и скорость роста клеток (по сравнению с обработкой трансфецирующим агентом, оценка при помощи количественной ПЦР в реальном времени и визуальных наблюдений).

2.14. Иммуногистохимическое окрашивание при помощи системы визуализации NOVOLINK

Приготовление образцов и окрашивание проводили по стандартным протоколам с модификациями. Образцы фиксировали в формалине с последующей заливкой в парафиновые блоки, приготовлением микросрезов на микротоме и окрашиванием эозином и гематоксилином/антителами.

Образцы фиксировали в забуференном 4% формалине в течение 24 час при комнатной температуре. Через сутки после начала фиксации образцы промывали проточной водой 6-7 час. Затем препараты подвергали дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации: 50, 60, 70, 80, 96% и 100%. После обезвоживания образцы дважды обрабатывали толуолом по 30 минут для очистки от остатков спирта. Затем материал помещали в чистый парафин при 56°C (2 смены по 24 и 120 час и заливочный парафин (56°C), содержащий 5% пчелиного воска (24 часа).

С помощью санного микротомы MC-2 из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 8-10 мкм. Срезы наносили на положительно заряженные предметные стекла, депарафинизировали, используя толуол, и регидратировали в градиенте концентраций этанола. После промывки срезов дистиллированной водой проводили демаскировку антигенов 0,2 % раствором Triton X-100 в PBS. Эндогенную пероксидазу нейтрализовали применением пероксидазного блока (5 мин). Затем следовала обработка TBS буфером (2 раза по 5 мин), инкубация

срезов с протеиновым блоком (5 минут), и промывка буфером TBS 2 раза по 5 мин. Срезы инкубировали с разведенными первичными антителами (разведение 1/100), усилителем проникновения полимера (30 минут), затем с вторичными антителами, конъюгированными с полимером (система визуализации NOVOLINK, Novocastra) (30 мин). После каждой инкубации материал промывали буфером TBS (2 раза по 5 мин). На финальной стадии инкубировали срезы с рабочим разведением DAB (1/20 в DAB буфере) в течение 5 мин, промывали водой. Материал докрашивали гематоксилином и промывали водой (5 минут). После дегидратации и очистки образцы покрывали заключающим раствором. Продукты иммунохимической реакции визуализировали, используя микроскоп Zeiss Axio Imaging (Zeiss, Германия), D1-камеры AxioCam HRm.

2.15. Массивное параллельное секвенирование РНК по технологии SOLiD 4

Библиотеки для секвенирования готовили по протоколу Applied Biosystems SOLiD™ Total RNA-Seq Kit Protocol.

Выделенную из биопсий кожи РНК очищали от примеси рРНК при помощи набора RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-Seq, Life Technologies. Тотальную РНК вместе с пробой RiboMinus инкубировали в термостате при 70°C в течение 5 минут, затем переносили в термостат на 37°C и инкубировали 30 минут для образования гибридных комплексов. Смесь наносили на подготовленные буфером RiboMinus™ Magnetic Beads, инкубировали 15 минут при 37°C, затем помещали в магнитный штатив и отбирали образец РНК, очищенный от рРНК. Процедуру повторяли трижды для полной очистки от рРНК.

Выделенную из биопсий тотальную РНК, очищенную от рРНК, фрагментировали путем инкубации с РНКазой III (10 мин., 37°C), затем концентрировали при помощи RiboMinus™ Concentration Module (Invitrogen). Качество и размер фрагментов оценивали при помощи RNA 6000 Pico Chip Kit на анализаторе Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent), а также набора Quant-iT™ RNA Assay Kit на флуориметре Qubit Fluorometer (Life Technologies). К фрагментам РНК лигировали адапторы SOLiD™ Adaptor Mix (инкубация 65 °C в течение 10

минут, затем охлаждение до 16°C в течение 5 мин и инкубация с лигазой на 16°C ночь). Затем проводили обратную транскрипцию с использованием ревертазы ArrayScript™ и праймером SOLiD™ RT Primer (инкубация смеси без ревертазы 70°C 5 мин, затем охлаждение на льду 1 мин и реакция обратной транскрипции 30 минут при 42°C). Полученную кДНК очищали набором MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen) по протоколу производителя, затем отбирали фрагменты кДНК нужного размера (150-200 п.н.), используя систему Novex® pre-cast gel products (Invitrogen). Фрагменты амплифицировали при помощи ПЦР с использованием праймеров SOLiD™ 5' и 3' PCR Primer и полимеразы AmpliTaq® DNA Polymerase. Реакцию проводили в объеме 100 мкл по следующей программе: первичная денатурация при 95°C 5 минут, затем цикл, состоящий из инкубации при 95°C 30 секунд, при 62°C 30 секунд, при 72°C 30 секунд, цикл повторяли 15 раз, затем проводили окончательную элонгацию при 72°C в течении 7 минут. Амплифицированную ДНК очищали на колонках PureLink™ PCR Micro Kit (Invitrogen). Оценивали концентрацию и качество полученной библиотеки на флуориметре Qubit (Life Technologies) и биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer набором DNA 1000 Kit (Agilent).

Дальнейшие работы по полногеномному секвенированию проводились специалистами компании «Геноаналитика» по рекомендованным протоколам производителя.

Полученные библиотеки секвенировали специалисты компании «Геноаналитика» на приборе SOLiD 4™ System по рекомендованным протоколам производителя. Анализ результатов проводили следующим образом: парные прочтения в формате color-space (*.csfasta), полученные в результате секвенирования, были картированы на референсный геном *Homo sapiens* (сборка GRCh37 Genome Reference Consortium Human Reference 37 (GCA_000001405.1) hg19) (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/bigZips/>) при помощи пакета программ BioScope (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_082377.pdf) с обработкой данных (фильтрацией прочтений по качеству,

удалением адаптерных последовательностей). На выходе были получены значения картированных прочтений в бинарном формате *.bam, и для каждого гена и экзона (по аннотации refGene) было определено количество прочтений в каждом образце, картирующихся на данный участок (ген или экзон). Подсчет прочтений в каждом образце, картировавшихся на каждый ген, позволил сравнить уровни экспрессии генов между образцами. Были идентифицированы дифференциально экспрессированные участки генома (дифференциально экспрессированные гены, а также те участки, которые не относились к аннотированным на сегодняшний день генам и являлись внегенными транскриптами). Анализ результатов проводили с помощью пакетов Bioconductor и DESeq, как описано в разделе «Статистическая обработка результатов».

2.16. Статистическая обработка результатов

Для статистического анализа результатов полногеномного секвенирования применяли пакет программ Bioconductor и его приложение DESeq (<http://www.bioconductor.org/>), которые разработаны для анализа данных высокопроизводительного секвенирования и используют программную среду и язык программирования для статистической обработки данных R (<http://www.r-project.org/>). Данные пакеты программ являются одними из наиболее точных и рекомендованы для анализа данных полногеномного секвенирования транскриптома при размерах выборки, сходных с проанализированными в данной работе (Zhang Z.H. et al., 2014, Anders, 2013 #180). Анализ в приложении DESeq проводили по стандартному протоколу для данного приложения (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DESeq/inst/doc/DESeq.pdf>).

Приложение DESeq основано на применении модели негативного биномиального распределения для оценки достоверности различий между выборками и позволяет решить проблему избыточной дисперсии в данных молекулярно-биологического анализа (Anders S. et al., 2010).

В ходе анализа выдвигается предположение, что количество прочтений в образце j , которые картируются на ген i , может быть описано при помощи негативного биномиального распределения по формуле

$$K_{ij} \sim \text{NB}(\mu_{ij}, \sigma_{ij}^2),$$

где μ_{ij} - это среднее ожидаемое количество прочтений для данного гена (i) в данном образце (j), σ_{ij}^2 – наблюдаемая дисперсия.

Кроме того, для каждого образца оценивается поправка на размер (size factor, s_j), которая позволяет сравнивать между собой экспрессию генов в разных образцах и позволяет нивелировать индивидуальные различия между образцами (например, учитывать разное количество отсеквенированных прочтений в каждом образце). При сравнении более двух образцов поправка на размер вычисляется по формуле

$$s_j = \text{median}_i \frac{k_{ij}}{(\prod_{v=1}^m k_{iv})^{1/m}}$$

где k – количество прочтений, v – варианса, m – количество образцов.

В приведенной формуле знаменатель может интерпретироваться как псевдо-референсный образец, который получен путем оценки среднего геометрического между образцами. Таким образом, поправка на размер для каждого образца вычисляется как медиана отношения значений j -го образца к псевдо-референсному образцу.

Дифференциальная экспрессия генов в зависимости от биологического состояния (в данном случае, в пораженной или визуально непораженной псориазом коже) оценивается путем сравнения средних значений по гену с учетом поправки на размер с применением биномиального теста. В качестве нулевой гипотезы выступает гипотеза об отсутствии различий в экспрессии генов, обусловленных биологическим состоянием (отсутствие вклада заболевания в изменения экспрессии генов), – а наблюдаемые различия в экспрессии обуславливаются индивидуальными различиями и внешними воздействиями. В качестве альтернативной гипотезы выступает гипотеза о том, что основная часть

различий обуславливается биологическим состоянием (именно заболевание вызывает изменения экспрессии генов).

Поскольку при большом количестве генов в анализе увеличивается вероятность возникновения ошибки первого рода (при которой ошибочно отрицается нулевая гипотеза), для увеличения достоверности полученных результатов применяли поправку на множественные сравнения (метод Бенджамини-Хохберга) (Benjamini Y. et al., 1995).

$$FDR = E \left[\frac{V}{R} \right],$$

где FDR – доля ложноположительных результатов, V – количество ошибок первого рода, R – количество отвергнутых нулевых гипотез.

Метод Бенджамини-Хохберга контролирует долю ложноположительных результатов на заданном уровне достоверности α (в данной работе применяли $\alpha < 0,05$). Для m проверяемых гипотез $H_1 \dots H_m$, которым соответствуют p-value $p_1 \dots p_m$ и заданного уровня достоверности α вычисляется наибольшее значение k , при котором справедливо, что

$$p_{(k)} \leq \frac{k}{m} \alpha,$$

где p – это p-value, α - уровень достоверности, m – количество проверяемых гипотез.

Затем отвергаются все нулевые гипотезы $H_{(i)}$ в пределах $i = 1, \dots, k$.

После применения поправки на множественные сравнения дифференциально экспрессированные гены с применением программного обеспечения MS Excel 2010 (Microsoft) были отсортированы по значимости отличий (FC) между образцами здоровой и пораженной кожи, затем проводился анализ с использованием баз данных и программных продуктов MetaCore (www.portal.genego.com/), DAVID (Huang da W. et al., 2009), KEGG (Kanehisa M. et al., 2000) что позволило идентифицировать сигнальные пути и процессы, обогащенные наиболее дифференциально экспрессированными генами.

Для анализа результатов количественной ПЦР в реальном времени применяли программное обеспечение MS Excel 2010 (Microsoft). Для оценки относительных уровней экспрессии генов использовали метод сравнения пороговых уровней амплификации ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak K.J. et al., 2001).

Данный метод основан сравнении значений пороговых циклов (Parisi R. et al.) гена-мишени, нормированных на значения пороговых циклов эндогенного контроля, и реализуется через формулу

$$\Delta\Delta C_{t(1,2)} = (C_{t_{\text{мишени}}} - C_{t_{\text{контроля}}})_1 - (C_{t_{\text{мишени}}} - C_{t_{\text{контроля}}})_2,$$

где 1 и 2 – два сравниваемых состояния

Достоверность полученных различий оценивали в программной среде R с применением непараметрических тестов (U-тест Манна-Уитни, критерий типа Колмогорова-Смирнова). U-тест Манна-Уитни используется для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака и позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий типа Колмогорова-Смирнова проверяет гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем U-тест Манна-Уитни.

2.17. Обогащение генных сетей дифференциально экспрессированными генами при помощи программного пакета MetaCore

Для построения генных сетей и обогащения карт генных взаимодействий дифференциально экспрессированными генами был использован программный пакет MetaCore (GeneGo, St. Joseph, MI). Данное приложение позволяет проводить функциональный анализ белок-белковых взаимодействий и взаимодействий белок-ДНК, метаболических и сигнальных путей, воздействий биоактивных молекул. Для анализа использовали списки ДЭГ с уровнями изменений экспрессии (FC), отфильтрованные по p-value. Анализ обогащений биологических процессов проводился при помощи онтологий генов. Для анализа генных сетей

были использованы три алгоритма: алгоритм прямых взаимодействий (direct interaction algorithm) для картирования белок-белковых взаимодействий; алгоритм «кратчайшего пути» (shortest path algorithm) для поиска и картирования взаимодействий, связывающих ДЭГ; алгоритм анализа сетей (analyze network algorithm) для идентификации процессов с высшими рангами, регулируемых или регулирующих ДЭГ (Ekins S. et al., 2006). Для поиска потенциальных регуляторов транскрипции ДЭГ применяли расчет обогащений в приложении Interactome данного пакета программ. Данный пакет основан на применении гипергеометрического распределения, а уровень обогащения (z-score) рассчитывается по следующей формуле

$$z - score = \frac{A - n \frac{R}{N}}{\sqrt{n \left(\frac{R}{N}\right) \left(1 - \frac{R}{N}\right) \left(1 - \frac{n-1}{N-1}\right)}} = \frac{A - \mu}{\sigma}$$

где A- количество узлов в сети, ассоциированных с экспериментальными данными или включенными в исходный список (input list); R – количество узлов в исходной выборке или узлов, ассоциированных с экспериментальными данным; N – количество узлов после фильтрации, n – общее количество узлов в сети, μ и σ , соответственно средняя и дисперсия гипергеометрического распределения (Bessarabova M. et al., 2012).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка полногеномных профилей экспрессии при псориазе

Псориаз является сложным многофакторным иммуноопосредованным заболеванием, в основе развития патологии лежат не просто изменения в экспрессии отдельных генов, а изменения сигнальных каскадов, связанных с воспалением, с нарушением созревания кератиноцитов и избыточной продукцией провоспалительных сигналов. Для того, чтобы идентифицировать всю совокупность транскрипционных изменений, связанных с развитием заболевания, мы применили новый перспективный метод – полногеномное секвенирование транскриптома (RNA-seq). Данная технология была разработана для проведения глубокого массивного параллельного секвенирования РНК. Она позволяет одновременно оценивать экспрессию всех генов генома с большей точностью и воспроизводимостью, чем экспрессионные микрочипы.

Были использованы пары биопсий, взятых из пораженной и визуально непораженной кожи одних и тех же пациентов, больных среднетяжелыми и тяжелыми формами псориаза, не получавшими лечения минимум в течение трех месяцев до взятия биопсий. Всего было собрано 19 пар биопсий, из которых была выделена РНК. Информация о пациентах приведена в таблице 5. Для приготовления библиотек и последующего секвенирования были использованы 28 образцов РНК, прошедшие первичную оценку качества (РНК, выделенная из 14 пар визуально непораженной и пораженной псориазом кожи пациентов).

Тотальную РНК использовали для приготовления библиотек и последующего секвенирования по технологии SOLiD4 (Applied Biosystems). При секвенировании длина определяемой последовательности ДНК (прочтения) составляла 50 пар нуклеотидов с одного конца и 25 пар нуклеотидов с другого. Было получено в среднем $100 \cdot 10^6$ прочтений на образец.

Полученные в результате секвенирования прочтения картировали на референсную последовательность генома при помощи программного пакета

BioScore. Всего в исследовании были идентифицированы 54150 транскриптов (в соответствии с базой данных Ensembl версии Grch37 (Curwen, 2004 #188).

Таблица 5. Информация о пациентах, биопсии которых были использованы для массивного параллельного секвенирования. Выделены образцы, не прошедшие первичную оценку качества образцов и не вошедшие в анализ.

№ образца	Пол	Возраст	PASI
7	ж	53	25
8	ж	42	18
9	ж	51	20
10	ж	37	12
11	ж	28	18
13	м	50	31
15	м	48	22
16	м	27	9
18	м	23	11
19	ж	56	30
20	ж	21	12
21	ж	18	7
22	м	34	15
23	м	72	35
24	ж	41	15
25	м	28	20
26	ж	44	18
27	ж	38	12
28	м	32	14

Дальнейший анализ с применением пакета Bioconductor программной оболочки R позволил идентифицировать дифференциально экспрессированные при псориазе гены. Был проведен попарный анализ экспрессии с поправкой на множественные сравнения, который позволил нам идентифицировать 1564 достоверно дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) из общего количества 53832 проанализированных транскриптов. За достоверные принимали изменения экспрессии в 1,5 и более раз ($FC \geq 1,5$) при попарном сравнении и уровне значимости 5% ($p\text{-value} < 0,05$), скорректированном с учетом уровня ложноположительных результатов меньше 0,05 ($FDR < 0,05$). Из

идентифицированных нами 1564 ДЭГ 938 генов характеризовались повышенной экспрессией в пораженной псориазом коже, а 626 – пониженной экспрессией.

Для оценки схожести образцов пораженной и визуально непораженной кожи применили иерархический подход, предполагающий в массиве данных наличие вложенных групп (кластеров различного порядка). Оценку проводили при помощи программной оболочки R, при этом использовали агломеративный алгоритм кластеризации `hclust` (Hierarchical Clustering). Функция `hclust` осуществляет иерархический кластерный анализ, используя множество различий n кластеризуемых объектов. Изначально каждый из объектов помещается в свой собственный кластер, затем алгоритм многократно повторяется, на каждом из этапов объединяя два наиболее близких кластера, пока наконец не останется лишь один общий кластер.

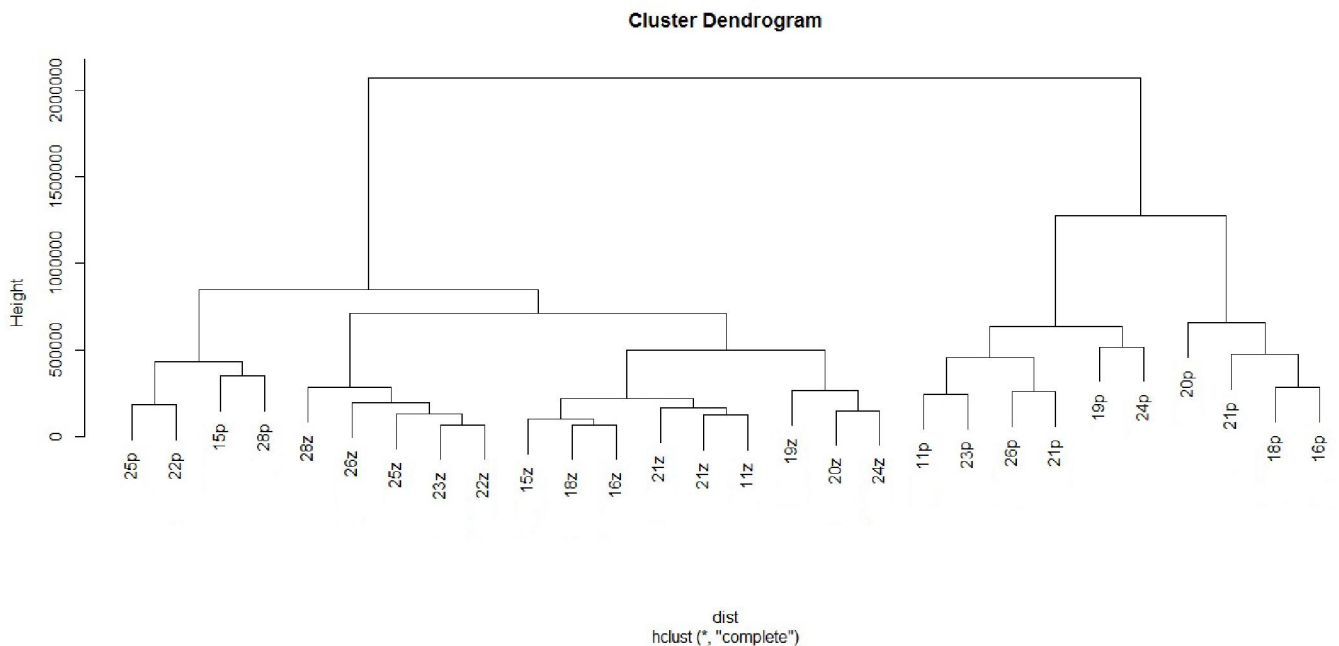


Рисунок 10. Кластеризация образцов, использованных для полногеномного анализа экспрессии (p – образец пораженной кожи, z – образец визуально непораженной кожи).

Проведенный анализ выделил два основных кластера (Рисунок 10), в одном из которых оказались только образцы, взятые из пораженных участков кожи (правый кластер), а в другой – образцы из здоровых участков и, отдельно от них,

образцы из пораженных участков кожи (левый кластер). Вероятно, такую кластеризацию образцов из пораженных участков кожи можно объяснить доминированием различных сигнальных каскадов в патогенезе заболевания, которые, тем не менее, приводят к сходным проявлениям у разных больных.

Для того, чтобы оценить соответствие полученных данных результатам, имеющимся в литературных источниках, было проведено сравнение полученных нами списков ДЭГ с недавно опубликованными результатами наиболее крупного анализа транскриптома 92 образцов пораженной кожи и 82 образцов непораженной кожи, проведенного Li et. al. (Li B. et al., 2014). Масштабность анализа позволила авторам идентифицировать большое количество дифференциально экспрессированных генов (6258 генов) с высоким уровнем достоверности. Сравнение результатов двух анализов выявило различия в списках ДЭГ (Рисунок 11).

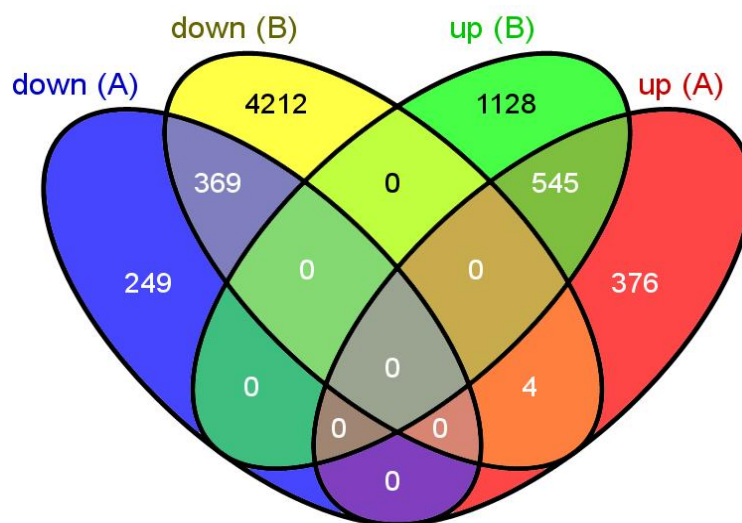


Рисунок 11. Сравнение списков дифференциально экспрессированных генов. Выборка А – исследование автора, изменения экспрессии на основе анализа 14 образцов пораженной кожи и 14 образцов непораженной кожи. Выборка В – данные Li et. al., изменения экспрессии на основе анализа 92 образцов пораженной кожи и 82 образцов непораженной кожи.

Вероятно, различия в списках идентифицированных ДЭГ в первую очередь объясняются разными размерами проанализированных выборок. Кроме того, были использованы разные платформы для секвенирования (в нашем исследовании – SOLID4, в исследовании Li et.al. Illumina Genome Analyser II), что

также объясняет различия в идентифицированных списках, поскольку SOLID лучше позволяет идентифицировать транскрипты с более высоким GC-составом, а Illumina Genome Analyser – с нейтральным и более низким содержанием GC (Tariq M.A. et al., 2011). Несмотря на это, большая часть ДЭГ, идентифицированных в нашем исследовании (~60%), по результатам Li et. al характеризовалась сходными изменениями экспрессии.

Следующим шагом в исследовании стал анализ списков дифференциально экспрессированных генов. Среди дифференциально экспрессированных генов, идентифицированных в ходе работы, выделили «ТОР-20» генов с наиболее активированной и наиболее ингибированной экспрессией (таблицы 6 и 7). Вероятно, продукты именно этих генов приводят к проявлению наиболее характерных гистопатологических изменений при псориазе. Их можно назвать «эффекторным паттерном псориаза», поскольку изменения экспрессии данных генов, по всей видимости, не инициируют заболевание, а связаны именно с его развитием и прогрессией. Белковые продукты генов данной группы могут рассматриваться как маркерные при разработке патогенетической терапии псориаза, а также использоваться в качестве мишеней при разработке паллиативной терапии заболевания. «ТОР-20» наиболее активированных генов связаны с защитным ответом и хемотаксисом, а «ТОР-20» наиболее ингибированных – с метаболизмом липидов.

Таблица 6. «ТОР-20» наиболее активированных при псориазе генов.

Название гена	Расшифровка названия	Кратность изменения экспрессии (Fold Change)	Log2 Fold Change	p-value	критерий FDR (Бенджамини -Хохберга)
<i>DEFB4B</i>	defensin beta 4B	56.74	5.83	0	0
<i>IL36A</i>	interleukin 36, alpha	38.31	5.26	0	0
<i>SERPINB4</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	36.69	5.20	9.08E-11	2.67E-08
<i>DEFB4A</i>	defensin, beta 4A	33.30	5.06	0	0
<i>SERPINB3</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B	31.55	4.98	0	0

	(ovalbumin), member 3				
SERPINB11	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11	28.58	4.84	0	0
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	28.29	4.82	0	0
S100A8	S100 calcium binding protein A8	27.64	4.79	0	0
DEFB103B	defensin, beta 103B	25.16	4.65	0	0
S100A9	S100 calcium binding protein A9	23.82	4.57	0	0
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	23.74	4.57	0	0
S100A12	S100 calcium binding protein A12	23.22	4.54	0	0
TMPRSS11D	transmembrane protease, serine 11D	22.69	4.50	0	0
S100A7A	S100 calcium binding protein A7A	21.59	4.43	0	0
PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived	21.39	4.42	0	0
SPRR2A	small proline-rich protein 2A	19.95	4.32	0	0
DEFB103A	defensin, beta 103A	19.23	4.27	7.30E-10	1.72E-07
NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible	18.53	4.21	4.46E-13	2.09E-10
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	17.26	4.11	5,09E-04	0.02
AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	17.01	4.09	0	0

Таблица 7. «ТОР-20» наиболее ингибированных при псориазе генов.

Название гена	Расшифровка названия	Кратность изменения экспрессии (Fold Change)	Log2 Fold Change	p-value	критерий FDR (Бенджамини-Хохберга)
GAL	galanin prepropeptide	0.05	-4.45	0	0
FADS2	fatty acid desaturase 2	0.05	-4.32	1.52E-10	4.28E-08
PM20D1	peptidase M20 domain containing 1	0.05	-4.32	1.39E-06	0.0002
IGHEP1	immunoglobulin heavy constant epsilon P1 pseudogene	0.05	-4.26	4.44E-16	3.24E-13
HSD3B1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-	0.05	-4.26	2.97E-05	0.002

	and steroid delta-isomerase 1				
<i>AWAT2</i>	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2	0.06	-4.14	0	0
<i>DGAT2L6</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 2-like 6	0.06	-4.03	7,54E-04	0.028
snoU13	small nucleolar RNA U13	0.06	-3.99	5.56E-11	1.72E-08
<i>ELOVL3</i>	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	0.06	-3.95	7.54E-05	0.004
<i>THRSP</i>	thyroid hormone responsive (SPOT14 homolog, rat)	0.07	-3.90	3.05E-07	4.16E-05
<i>RP4-539M6</i>	novel lincRNA	0.07	-3.82	4.29E-05	0.0028
<i>AWAT1</i>	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1	0.07	-3.81	5,66E-04	0.02
<i>RP11-546K22.1</i>	novel lincRNA	0.08	-3.73	3.20E-13	1.54E-10
<i>HAO2</i>	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	0.08	-3.70	7.64E-05	0.004
<i>PNPLA5</i>	patatin-like phospholipase domain containing 5	0.08	-3.64	4.10E-07	5.45E-05
<i>RP11-247A12.1</i>	novel lincRNA	0.09	-3.55	3.87E-12	1.44E-09
<i>IGHE</i>	immunoglobulin heavy constant epsilon	0.09	-3.48	1.14E-09	2.54E-07
<i>CRAT</i>	carnitine acetyltransferase	0.10	-3.39	4.50E-05	0.0028
<i>HSD3BP2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta, pseudogene 2	0.10	-3.32	5.79E-08	9.40E-06
<i>MOGAT2</i>	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	0.11	-3.18	2.57E-13	1.29E-10

3.2. Сигнальные каскады, измененные при псориазе

Для того чтобы проанализировать измененные при псориазе процессы, приводящие к появлению «эффекторного паттерна псориаза», использовали приложения для анализа обогащения – базы данных DAVID (Huang da W. et al., 2009), KEGG (Kanehisa M. et al., 2000), программный пакет MetaCore (www.portal.genego.com/). Уровень значимости обогащения оценивался с учетом

p-value, рассчитанного по формуле гипергеометрического распределения и нормализованного с учетом поправки на множественные тесты (FDR).

Проведенный функциональный анализ данных профилирования транскриптома позволил выделить процессы и сигнальные каскады, обогащенные дифференциально экспрессированными генами, а также описать их в унифицированных терминах генных онтологий (gene ontologies, GO) (Таблица 8, Рисунок 12). Такое описание позволяет избежать неоднозначных трактовок, которые зачастую возникают при описании сложных процессов, наблюдаемых в организме в норме и при патологии.

Таблица 8. Наиболее измененные при псориазе сигнальные каскады. База данных KEGG.

Название сигнального каскада, GO	Количество генов, участвующих в каскаде	p-value
Сигнальные каскады, достоверно активированные при псориазе		
Взаимодействие цитокинов и их рецепторов hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	53	1,20E-14
Пути сигнальных каскадов хемокинов hsa04062:Chemokine signaling pathway	39	3,10E-11
Сигнальный каскад Jak-STAT hsa04630:Jak-STAT signaling pathway	23	1.72E-05
Цитотоксичность, опосредованная НК-клетками hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	26	4,39E-07
Сигнальный путь NOD-подобного рецептора hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway	17	7,05E-07
Гематопоз hsa04640:Hematopoietic cell lineage	17	6,31E-05
Реакция «трансплантат против хозяина» hsa05332:Graft-versus-host disease	11	9,63E-05
Процессинг и презентация антигена hsa04612:Antigen processing and presentation	16	1,51E-04
Молекулы клеточной адгезии hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	20	4,67E-04
Пути обнаружения ДНК в цитоплазме hsa04623:Cytosolic DNA-sensing pathway	11	5.11E-04
Сигнальные каскады, достоверно ингибированные при псориазе		
Сигнальный каскад рецептора PPAR hsa03320:PPAR signaling pathway	12	1,12E-05
Биосинтез ненасыщенных жирных кислот hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	0,001505
Биосинтез стероидных гормонов	6	0,007007

hsa00140: Steroid hormone biosynthesis		
Метаболизм азота hsa00910: Nitrogen metabolism	4	0,021979
Сокращение гладкой мускулатуры сосудов hsa04270: Vascular smooth muscle contraction	7	0.046542
Кальций-опосредованные сигнальные каскады hsa04020: Calcium signaling pathway	9	0.05030
Метаболизм пропановой кислоты hsa00640: Propanoate metabolism	4	0,051843

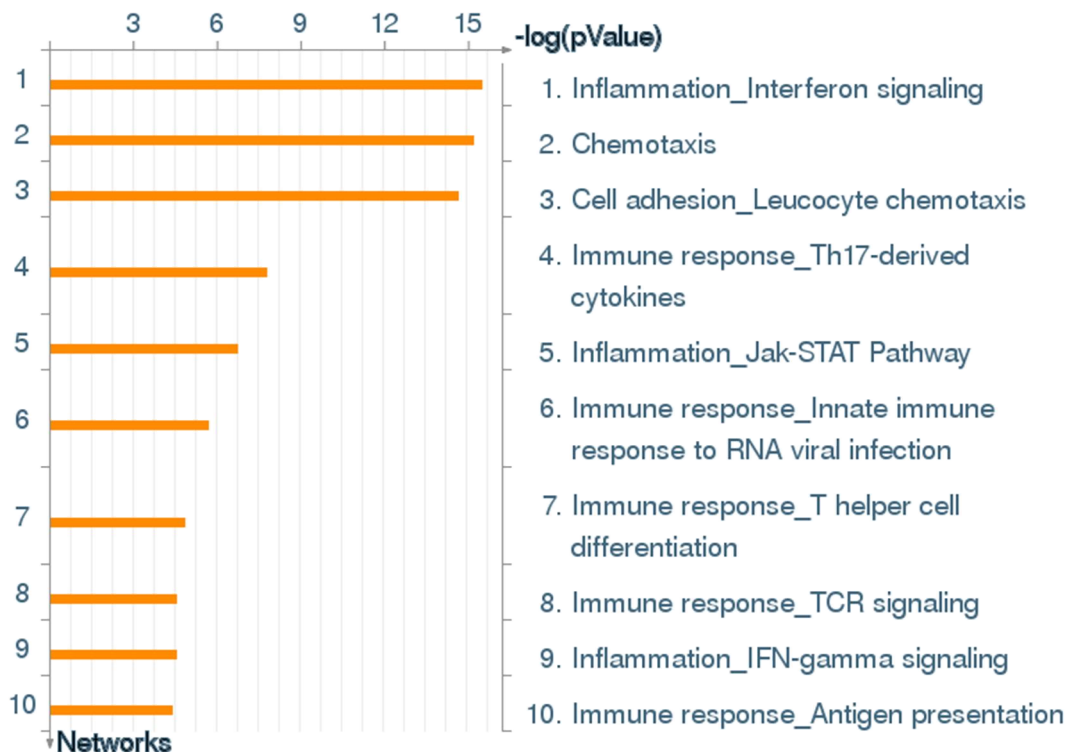


Рисунок 12. TOP-10 генных сетей, обогащенных генами с измененной при псориазе экспрессией.

Анализ обогащения показал, что наиболее активированными при псориазе являются сигнальные каскады, связанные с иммунным ответом и развитием воспаления – каскады продукции хемокинов и взаимодействия цитокинов и их рецепторов, вызывающие миграцию активированных иммунных клеток, а также пути процессинга и презентации антигена и каскады противовирусной защиты. Кроме того, гены с повышенной при псориазе экспрессией участвуют в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса, перестройки цитоскелета, клеточной адгезии, развития и дифференцировки клеток. Ингибированными при псориазе

оказались сигнальный каскад рецептора PPAR, а также процессы, связанные с метаболизмом процессами жирового обмена, продукцией адипокинов и дифференцировкой жировых клеток.

Описанные сигнальные каскады характерны для псориатического воспаления в коже и отражают основные особенности, связанные именно с псориазом: цитокиновый шторм в очагах, дифференцировку Т-клеток по Th17/Th22 пути, продукцию большого количества IFN- γ в ответ на активацию TLR-опосредованных сигнальных каскадов комплексами LL-37 с нуклеиновыми кислотами, а также нарушения проницаемости и барьерных свойств кожи.

3.3. Поиск основных регуляторов транскрипции, связанных с развитием заболевания

Следующей задачей стал поиск возможных транскрипционных регуляторов дифференциально экспрессированных генов. С использованием базы данных взаимодействий Interactome Metacore был проведен анализ обогащений, который позволил выявить основные транскрипционные регуляторы ДЭГ.

В отличие от анализа генных онтологий, который, в первую очередь, применим для выявления основных групп и общих взаимосвязей в списке генов, данное приложение применяется для более детального анализа и позволяет на основе имеющихся в литературе данных провести анализ обогащений и выявить из списка дифференциально экспрессированных генов те, уровень связанности которых (z-score) статистически достоверно выше, чем этого можно было бы ожидать случайным образом. Информация о функциях белков, имеющаяся в базе данных и выявленная по литературным источникам, позволяет выдвинуть предположения о функциональных ролях данных взаимосвязей. Кроме того, этот тип анализа позволяет выявить связи между анализируемыми генами и общей базой взаимодействий, оценить их количество и качество и идентифицировать регуляторы анализируемых генов (Bessarabova M. et al., 2012). Применение такого подхода позволяет идентифицировать те регуляторы, которые, не будучи сами дифференциально экспрессированными, тем не менее, оказывают большое

влияние на изучаемые процессы. Это является значительным преимуществом подхода, поскольку зачастую регуляция функций транскрипционных факторов осуществляется не на уровне изменений экспрессии, а на уровне пост-трансляционных модификаций (в первую очередь, фосфорилирования), образования регуляторных комплексов с различным субъединичным составом и т.п.

Проведенный анализ позволил выявить транскрипционные факторы, которые выступают в качестве ключевых регуляторных звеньев сигнальных каскадов, обогащенных дифференциально экспрессированными генами при псориазе (Рисунок 13 и приложение 2). Диаграмма, изображенная на рисунке 13, была создана при помощи программного пакета для визуализации Circos (www.circos.ca) и отображает основные транскрипционные факторы, регулирующие ДЭГ. 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. Кроме того, 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 (STAT, NFkB, T_bet, IRF, AP-1, C_EBP и другие), были идентифицированы транскрипционные факторы, ранее не ассоциированные с псориазом в литературе (Таблица 9). Для выявления функциональной роли данных белков в патогенезе необходим дальнейший анализ, однако, результаты проведенного анализа в приложении Interactome Metascore и анализа литературных данных позволяют высказать предположение о том, что данные транскрипционные факторы выступают в качестве регуляторов проанализированных сигнальных каскадов, связанных с развитием псориаза.

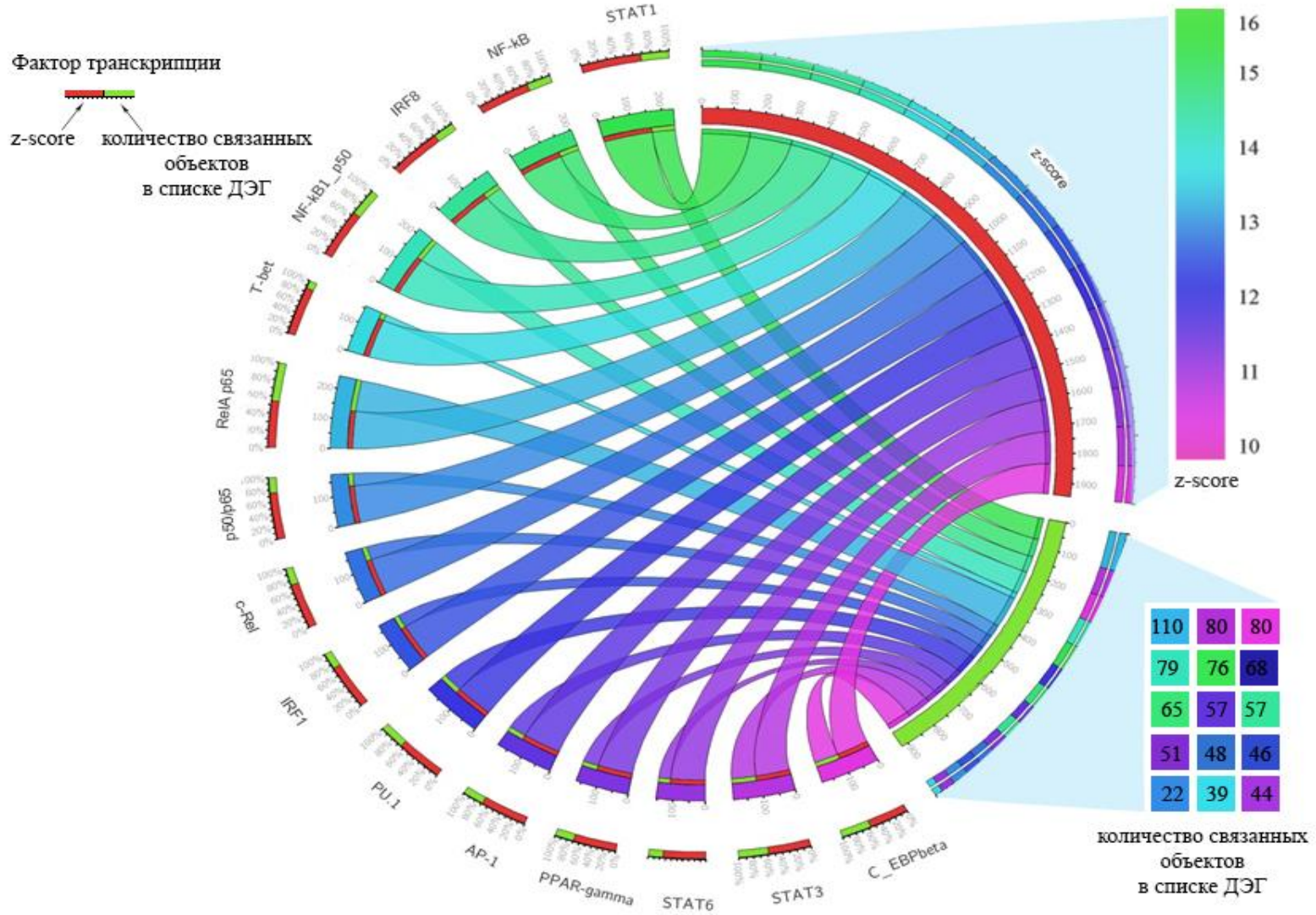


Рисунок 13. Top15 регуляторов дифференциально экспрессированных генов (пояснения в тексте).

Таблица 9. Транскрипционные факторы, идентифицированные в ходе анализа в качестве потенциальных регуляторов псориазического процесса, ранее не ассоциированные с псориазом.

Название транскрипционного фактора (ТФ)	Кол-во связей ТФ с генами в списке ДЭГ (A)	Общее кол-во ДЭГ в анализе (n)	Общее кол-во связей ТФ с генами в базе данных (R)	Кол-во объектов в базе данных (N)	Количество связей, ожидаемое случайно (E)	A/E	z-score (уровень обогащения списка ДЭГ связями данного ТФ)	p-value
NKRF	3	1195	3	26674	0.13	22.32	8.00	8.97E-05
ETS1	48	1195	378	26674	16.93	2.83	7.78	8.76E-11
ELF4	6	1195	13	26674	0.58	10.30	7.27	1.04E-05
ESR1	105	1195	1208	26674	54.12	1.94	7.24	5.67E-11
CAR/RXRα	8	1195	22	26674	0.99	8.12	7.23	2.89E-06
EGR3	7	1195	18	26674	0.81	8.68	7.06	7.33E-06
HNF4α	48	1195	451	26674	20.20	2.38	6.38	3.01E-08
SREBP1	22	1195	144	26674	6.45	3.41	6.28	4.74E-07
RBP-Jκ (CBF1)	19	1195	117	26674	5.24	3.62	6.16	1.10E-06
HMG1/Y	11	1195	54	26674	2.42	4.55	5.65	2.26E-05
EGR2 (Krox20)	13	1195	73	26674	3.27	3.98	5.51	1.94E-05
ASH2	5	1195	15	26674	0.67	7.44	5.40	3.69E-04
ZNF263	3	1195	6	26674	0.27	11.16	5.39	1.62E-03
PURB	3	1195	6	26674	0.27	11.16	5.39	1.62E-03
NF45	2	1195	3	26674	0.13	14.88	5.21	5.84E-03
NFYB	17	1195	119	26674	5.33	3.19	5.18	2.29E-05
Nkx6.1	4	1195	11	26674	0.49	8.12	5.11	1.03E-03
FOXO3A	22	1195	179	26674	8.02	2.74	5.07	1.81E-05

NFYA	17	1195	126	26674	5.64	3.01	4.90	4.84E-05
PLZF/RARα fusion protein	12	1195	74	26674	3.32	3.62	4.89	1.04E-04
PURα	5	1195	20	26674	0.90	5.58	4.44	1.58E-03
RBCK1	2	1195	4	26674	0.18	11.16	4.40	1.13E-02
FKHR	22	1195	215	26674	9.63	2.28	4.09	2.80E-04
E2F5	5	1195	23	26674	1.03	4.85	4.00	3.07E-03
TLE3	2	1195	5	26674	0.22	8.93	3.84	1.83E-02
ELF5	5	1195	25	26674	1.12	4.46	3.75	4.50E-03
CBFβ	7	1195	43	26674	1.93	3.63	3.74	2.79E-03
FOXP2	20	1195	204	26674	9.14	2.19	3.69	8.92E-04
USF1	21	1195	219	26674	9.81	2.14	3.67	8.95E-04
ERR2	10	1195	76	26674	3.40	2.94	3.66	2.04E-03
FOXA1	3	1195	11	26674	0.49	6.09	3.65	1.13E-02
IKZF1	9	1195	66	26674	2.96	3.04	3.60	2.62E-03
ERR1	19	1195	194	26674	8.69	2.19	3.59	1.20E-03
MBD1	3	1195	12	26674	0.54	5.58	3.44	1.46E-02
TFAP4	8	1195	60	26674	2.69	2.98	3.32	5.13E-03
NeuroD/E47	3	1195	13	26674	0.58	5.15	3.24	1.83E-02
FOXA2	21	1195	260	26674	11.65	1.80	2.82	6.92E-03

3.4. Анализ карт генных взаимодействий, обогащенных дифференциально экспрессированными при псориазе генами

Существует две основные гипотезы возникновения псориаза: так называемая «иммуноцентрическая», которая предполагает первичным некий иммунный или аутоиммунный сигнал, запускающий воспаление, а также «кератиноцитцентрическая», в которой причины псориаза связывают с абберациями, присущими кератиноцитам при псориазе (Lowes M.A. et al., 2007). Учитывая успех различных «биолоджиков» в терапии псориаза, можно сделать вывод о преимущественной роли иммунологических аббераций в патогенезе заболевания. Однако, как и другие методы лечения, большинство «биолоджиков» купирует симптомы заболевания на ограниченный период, после чего наступает рецидив псориаза (Smith C.H. et al., 2009). Кроме того, даже после наступления устойчивой ремиссии заболевания, структурные клетки кожи больных несут «молекулярный шрам», что косвенно свидетельствует о нарушениях, присущих кератиноцитам, играющих роль в развитии заболевания. Поэтому одно из приоритетных направлений исследований псориаза- идентификация триггера, запускающего патологию, при этом нельзя недооценивать роль структурных клеток кожи в манифестации заболевания.

Таким образом, в данной работе нас в первую очередь интересовала идентификация того вклада, который в развитие патологии несут структурные клетки кожи, и идентификация измененных сигнальных каскадов, связанных с активной пролиферацией и нарушенной дифференцировкой кератиноцитов. Поэтому среди достоверно измененных сигнальных каскадов выделили сети, связанные именно с изменениями кератиноцитов и структурно-функциональными изменениями эпидермиса, и провели их анализ в контексте патогенеза заболевания.

3.4.1. Ремоделирование внеклеточного матрикса

Основные изменения, наблюдаемые при псориазе, – повышенная инфильтрация очагов поражения иммунными клетками, вазодилатация, извитие

сосудов и повышение сосудистой проницаемости, а также активная пролиферация и сниженный апоптоз кератиноцитов, - тесно связаны между собой. Проллиферация кератиноцитов опосредована потерей тесных межклеточных связей и активными процессами ремоделирования внеклеточного матрикса, которые происходят при участии класса ферментов, называемых матриксными металлопротеазами.

Ремоделирование внеклеточного матрикса (Рисунок 14) происходит в ходе различных процессов как в норме – при развитии зародыша, заживлении ран, ангиогенезе, так и при патологии – легочном фиброзе, системном склерозе, сердечно-сосудистых заболеваниях, образовании метастазов (Larsen M. et al., 2006). Матриксные металлопротеазы (ММР) – это семейство протеолитических ферментов, которые процессируют различные составляющие внеклеточного матрикса – коллаген, эластин, фибрин, ламинин и другие. Кроме того, они отвечают за созревание некоторых белков и рецепторов – например, плазминогена, предшественника рецептора эпидермального фактора роста, различных хемокинов и цитокинов. Эндогенные ингибиторы металлопротеаз (TIMPs) ограничивают избыточную деградацию внеклеточного матрикса, и баланс между активированными ММР и их ингибиторами лежит в основе поддержания гомеостаза тканей. В коже матриксные металлопротеазы, в основном, продуцируются иммунными клетками - нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, а также структурными клетками кожи - кератиноцитами, фибробластами и эндотелиальными клетками (Raffetto J.D. et al., 2008) (Mezentsev A. et al., 2014).

Проведенный полногеномный анализ показал, что при псориазе наблюдается избыточная экспрессия генов металлопротеаз *MMP9*, *12*, *25*, *MMP1* (FC=3.21; 5.39; 2.10; 4.57 соответственно), а также снижена экспрессия их эндогенных ингибиторов *TIMP3* и *4* (FC=0.48; 0.34, соответственно). Среди субстратов перечисленных матриксных металлопротеаз наибольшую группу представляют компоненты внеклеточного матрикса: ММР1 (интерстициальная, или

фибробластная коллагеназа) процессирует интерстициальный коллаген I, II и III типов; субстратами MMP9 (желатиназы B) являются коллагены IV, V, XI, XIV и неколлагеновые субстраты – эластин, ламинин, желатин; MMP11 (стромеолизин 3) процессирует коллаген IV типа, желатин, фибронектин и ламинин; MMP12 (макрофагальная эластаза) - эластин, коллаген IV, фибронектин, ламинин и протеогликан. Помимо компонентов внеклеточного матрикса, вышеупомянутые ферменты участвуют в созревании некоторых цитокинов до активных форм – например, IL-1 β , IL8, TGF β , являющегося хемоаттрактантом для моноцитов (FC=6,49; 16,3; 1,41, соответственно), а также процессинге про-MMP в активные формы (Mezentsev, 2014 #108).

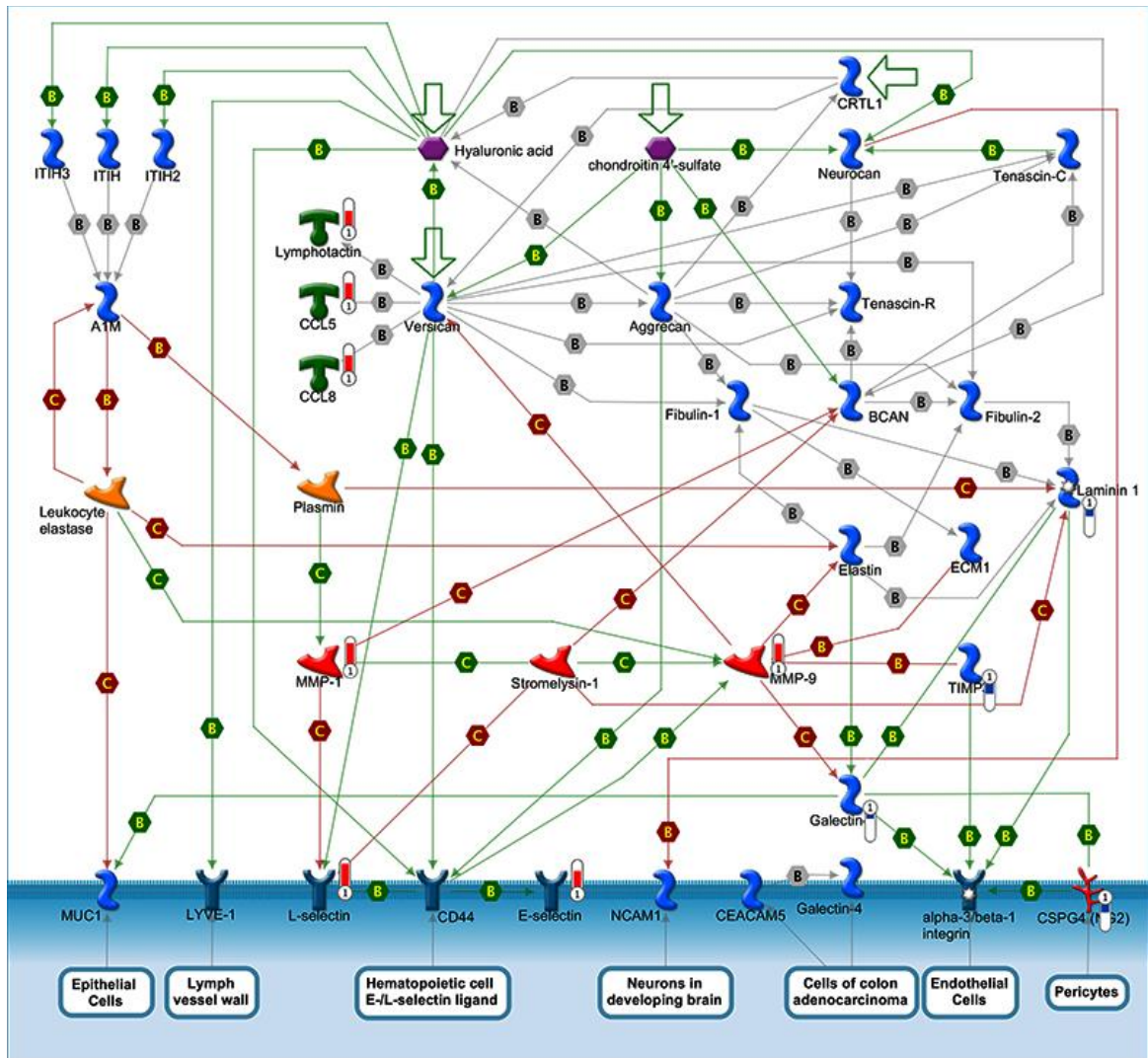


Рисунок 14. Карта генных взаимодействий сигнальных каскадов клеточной адгезии и ремоделирования внеклеточного матрикса. Обозначения приведены в приложении 1.

Недавнее исследование (Starr A.E. et al., 2012) показало, что MMP25 (лейколизин, нейтрофил-специфичная протеаза) проявляет слабую активность в отношении «классических» субстратов металлопротеаз, таких, как компоненты внеклеточного матрикса, однако, активно процессирует различные хемокины (*CXCL2,6,9, CCL2,4,7,13*) (FC=4,84; 3,75; 6,05; 2,54; 4,77; 3,26; 1,66, соответственно). Такой процессинг может приводить к усилению рекрутинга иммунных клеток и их активации: например, процессинг хемокина *CXCL5*, являющегося аттрактантом нейтрофилов, активирует данный хемокин, повышая его агонизм, и, в свою очередь, усиливает рекрутинг нейтрофилов, его продуцирующих (Starr A.E. et al., 2012).

Таким образом, активация данного сигнального каскада в коже больных псориазом 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 псориатических повреждений. Потеря клетками эпидермиса межклеточных контактов может, в свою очередь, приводить к изменениям их экспрессионных профилей, снижению дифференцировки и увеличению пролиферативной активности.

Основными транскрипционными регуляторами металлопротеаз являются транскрипционные факторы AP-1, PEA3, Sp-1, b-catenin/Tcf-4 и NF-kB (Yan C. et al., 2007). Анализ промоторных областей при помощи базы данных UCSC Genome Browser database, основанной на данных проекта ENCODE, показал, что все гены металлопротеаз, гиперэкспрессированные по результатам нашего исследования, несут в промоторных областях сайты связывания AP-1. Помимо этого, в исследованиях (Tower G.B. et al., 2003);(Takagi S. et al., 2009); (Belguise K. et al., 2005); (Bergman M.R. et al., 2003) было показано, что FRA1 - один из компонентов транскрипционного фактора AP-1 - является регулятором транскрипции генов металлопротеаз *MMP1*, *MMP2* и *MMP9*, и напрямую индуцирует их активность,

связываясь с промоторными областями генов. Таким образом, можно выдвинуть гипотезу о важной роли FRA1 в регулировании ремоделирования внеклеточного матрикса, созревания провоспалительных цитокинов и других MMP-опосредованных событий, наблюдаемых в ходе псориатического процесса.

3.4.2. Ремоделирование цитоскелета кератиноцитов

Процессы ремоделирования внеклеточного матрикса и потери межклеточных контактов тесно связаны с процессами ремоделирования цитоскелета кератиноцитов, что объясняется активным делением и миграцией кератиноцитов из базального слоя на поверхность эпидермиса (Рисунок 15). В ходе проведенного полногеномного анализа среди дифференциально экспрессированных были идентифицированы гены кератинов (*KRT6A*, *KRT6B*, *KRT6C*, *KRT16*, *KRT17*, *KRT7*, *KRT8*, *KRT2* (FC=15,68; 7,95; 14,06; 9,54; 2,29; 1,73; 0,52; 0,5, соответственно), плакинов (*PKP2* FC=0,58; *EPPK* FC=0,67), циклин-зависимой киназы *CDK1* (FC=2,24).

Плакофилины, например, *PKP2*, локализуются в десмосомах и адгезионных контактах эпидермиса, участвуют в связывании кадгеринов с промежуточными филаментами цитоскелета и необходимы для нормальной десмосомальной адгезии. Пониженная экспрессия гена *PKP2*, который в норме экспрессируется в базальных кератиноцитах, связана с повышением активности малой ГТФазы RhoA и накоплением стрессовых волокон, нарушением образования и созревания десмосом, изменениями адгезии кератиноцитов к субстрату, а также с нарушениями образования межклеточных контактов (Zhang J. et al., 2005, Godsel L.M. et al., 2010). Кроме того, плакофилины тесно связаны с процессами клеточной дифференцировки и могут, в свою очередь, модулировать сигнальную трансдукцию, например, путем изменения сигнальной активности бета-катенина и пути wnt-опосредованной передачи сигнала (Demirag G.G. et al., 2011).

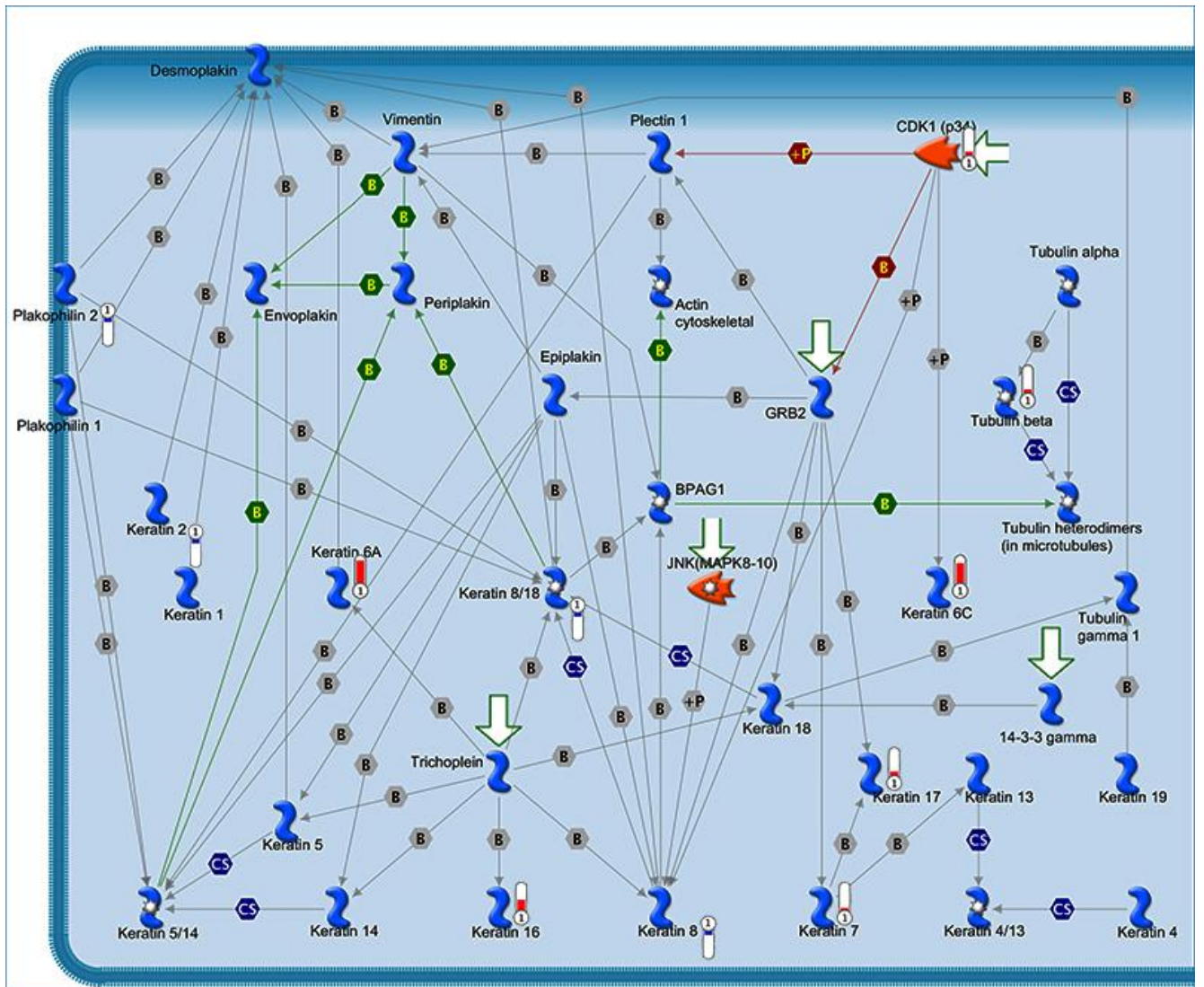


Рисунок 15. Карта генных взаимодействий сигнальных каскадов ремоделирования цитоскелета. Обозначения приведены в приложении 1.

Изменения экспрессии генов кератинов, которые можно наблюдать на этой карте, связаны с характерными особенностями псориаза - гиперпролиферацией кератиноцитов, паракератозом и межсосочковым акантозом. При псориазе может наблюдаться повышенная экспрессия генов кератинов *KRT6A*, *KRT16*, *KRT6C*, *KRT17* и пониженная – *KRT18*, *KRT19*, *KRT8*, *KRT7*, *KRT4/13*, *KRT4*, *KRT2* (Vaidya, 2007 #120). Кератины 6А, 6С и 16, которые характеризуются повышенной экспрессией, являются маркерами гиперпролиферации. Они участвуют в образовании промежуточных кератиновых филаментов, кроме того, в норме данные кератины участвуют в процессах заживления ран – поэтому экспрессия их генов повышена при псориазе. Повышенная экспрессия гена *KRT7*, как правило,

связана с различными новообразованиями, его повышенная экспрессия по результатам анализа также может быть связана с гиперпролиферацией. Кератин 17 в норме не экспрессируется в эпидермисе, однако, также участвует в процессах заживления ран – у мышей в нокаутных тканях *K17^{-/-}* наблюдается нарушение заживления ран. Кератины 8, 18 и их димеры участвуют в процессах дифференцировки клеток, а также индуцируемых FAS и TNF путях апоптоза, поэтому наблюдается их пониженная экспрессия в очагах псориазического поражения. Кератин 2 в норме присутствует в дифференцированном эпидермисе, однако, в связи с нарушениями дифференцировки клеток при псориазе в проанализированных образцах его экспрессия была понижена.

Формирование и организация промежуточных филаментов регулируется киназными каскадами, например, митоген-активируемыми протеинкиназами MAPK8 и 10, а также циклин-зависимой киназой CDK1, экспрессия которой была повышена по результатам исследования (FC=2,24).

Экспрессия генов кератинов находится под регуляцией транскрипционных факторов AP-1 и SP1 (кератин 16), C/EBP и AP-2 (кератин 10), AP-1 и ETS (кератины 8/18), RAR, RXR и AP-1 (кератины 6A, B, C) (Vaidya M.M. et al., 2007, Торпа Н., 2011).

3.4.3. Клеточный цикл и пролиферация

Переход клеток из одной фазы жизненного цикла в другую, и, соответственно, их пролиферация, находятся под контролем различных механизмов. Одними из основных регуляторов этих процессов выступают циклины и циклин-зависимые киназы (Buchakjian M.R. et al., 2010). В клетках млекопитающих различные комплексы «циклин+циклин-зависимая киназа» регулируют различные фазы клеточного цикла: циклин D-CDK4/6 активируют переход в фазу G1, циклин E-CDK2 - переход G1-S, циклин A-CDK2 – переход в S-фазу, циклин A/B-CDK1 - вход в M-фазу (Coqueret O., 2002). Нарушения жизненного цикла кератиноцитов при псориазе, их короткое время созревания и

активная пролиферация связаны с повышенной экспрессией циклинов A и B и пониженной – циклина D, а также с измененной активностью циклин-зависимых киназ (Miracco C. et al., 2000).

Проанализированные нами образцы характеризовались повышенной экспрессией циклинов A2, B1, B2, E1 и пониженной экспрессией циклина D1 (FC=2,07; 2,81; 2,07; 3,64; 0,62, соответственно), повышенной экспрессией киназы *CDK1* и регуляторной субъединицы *CDK5*, *p35* (FC=2,24 и 2,57, соответственно) (Рисунок 16).

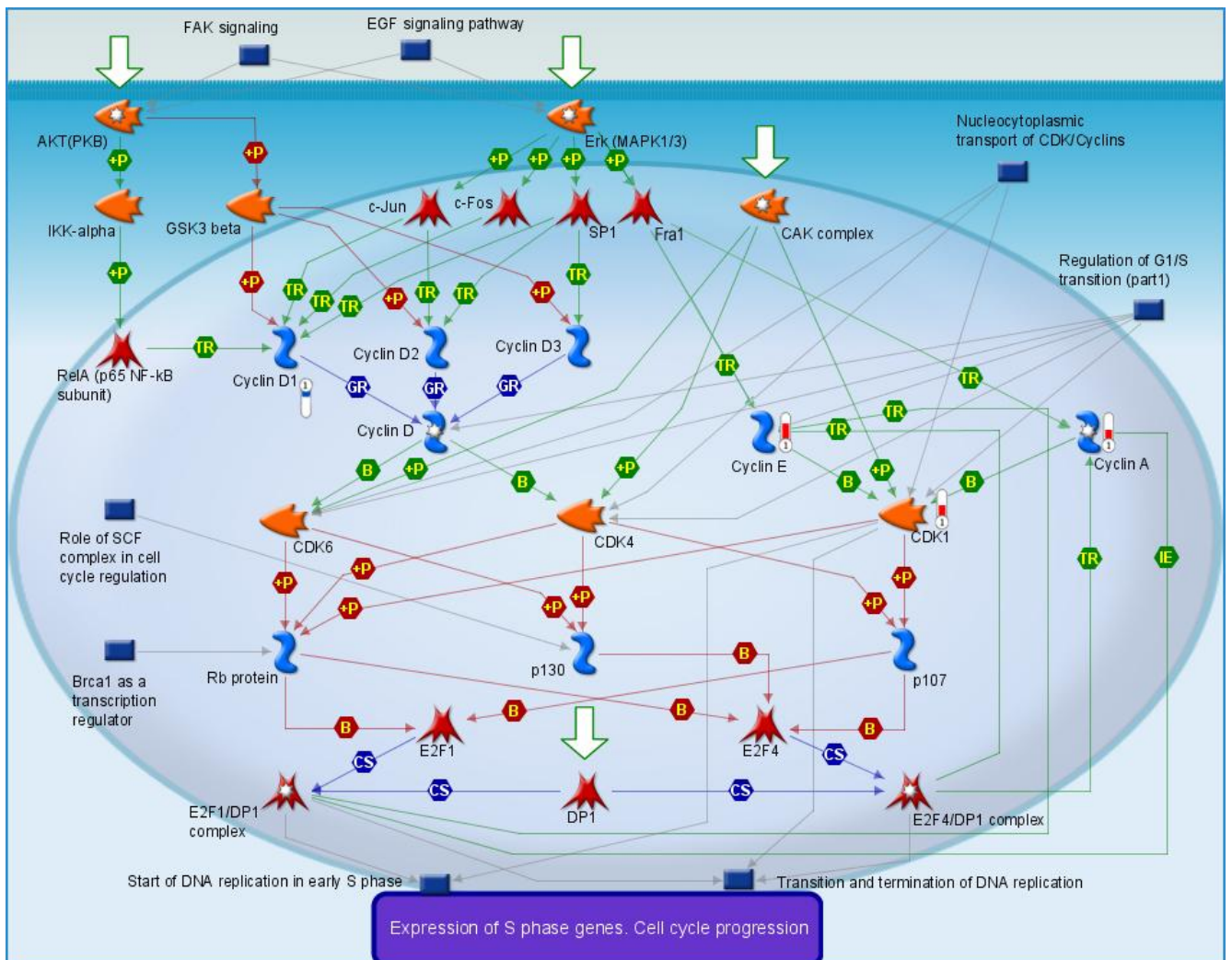


Рисунок 16. Карта генных взаимодействий регуляции клеточного цикла.

Экспрессия генов циклинов находится под контролем различных транскрипционных факторов (например, белков AP-1, Sp1, E2F, NFkB и других). Активация MAPK- и AKT-киназных сигнальных каскадов, наблюдаемая при

псориазе, приводит к фосфорилированию субъединиц транскрипционных факторов, их связыванию с промоторными областями генов циклинов и последующим изменением экспрессии циклинов, что приводит к активной пролиферации кератиноцитов, наблюдаемой при псориазе. Casalino et al показали, что член AP-1, FRA1 связывается с несколькими сайтами в промоторной области циклина A2, регулируя его экспрессию и переход клеток к делению. Данная регуляция осуществляется в комплексе с другим членом AP-1, JUNB (Casalino L. et al., 2007).

Таким образом, регуляторный потенциал FRA1 может реализовываться при псориазе через изменения уровней экспрессии циклинов и циклин-зависимых киназ, что приводит к постоянной активации сигнальных каскадов, стимулирующих пролиферацию клеток, и гиперпролиферации кератиноцитов, наблюдаемой в ходе заболевания.

3.4.4. Цитокин-опосредованные сигнальные каскады

Нарушения пролиферации и дифференцировки кератиноцитов и их aberrantная активация приводят к продукции избыточного количества хемоаттрактантов, вследствие чего активированные иммунные клетки мигрируют в область будущей псориазической бляшки, где они, в свою очередь, продуцируют цитокины и вызывают дальнейшую активацию кератиноцитов.

Среди цитокинов, которые являются важными регуляторами гомеостаза и воспаления в коже, можно отметить TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-17, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23 (Sabat R. et al., 2007, Hanel K.H. et al., 2013). К некоторым из них, например, к интерлейкинам IL-12 и IL-23 (Bernard F.X. et al., 2012), кератиноциты не экспрессируют функциональных рецепторов, поэтому воздействие таких цитокинов на кератиноциты опосредовано другими клетками. Однако, большая группа цитокинов напрямую воздействует на кератиноциты и является регуляторами их жизненного цикла: IL-1 (IL-1 α и β), IL-2 (IL-4, IL-13, IL-21), IL-4 (IL-4, IL-13), IL-6 (IL-6, OSM, IL-31), IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24), IL-17 (IL-

17A, IL-17C и IL-17F), IFN (IFN- α , IFN- γ), TNF (TNF- α , TNF- β) (Hanel K.H. et al., 2013). Зачастую эффекты тех или иных цитокинов проявляются только в соответствующем окружении, например, при предварительной активации кератиноцитов соответствующими цитокинами.

Проанализированные нами биологические образцы характеризовались измененной экспрессией многих цитокинов, связанных с регуляцией жизненного цикла кератиноцитов и развитием воспаления (Таблица 10).

Таблица 10. Изменения экспрессии генов интерлейкинов, идентифицированные в результате проведенного анализа.

Название гена (hgnc_symbol)	Fold Change	p-value	FDR
<i>IL10RA</i>	2,16	6.88E-05	4.02E-03
<i>IL12RB2</i>	1,89	5.03E-04	0.02
<i>IL17A</i>	3,29	3.86E-05	2.51E-03
<i>IL17C</i>	2,89	5.85E-05	3.49E-03
<i>IL17F</i>	4,54	1.51E-06	1.60E-04
<i>IL17RE</i>	0,52	4.72E-04	0,02
<i>IL19</i>	16,59	3.44E-08	5.75E-06
<i>IL1B</i>	6,49	8.66E-13	3,67E-10
<i>IL1RN</i>	2,16	8.11E-05	4.57E-03
<i>IL20</i>	8,63	0	0
<i>IL22</i>	2,62	6.13E-04	0.02
<i>IL24</i>	2,44	1.88E-04	9.25E-03
<i>IL26</i>	3,12	1.12E-06	1.26E-04
<i>IL2RA</i>	2,82	6.20E-07	7.85E-05
<i>IL2RG</i>	2,37	1.30E-05	0.001.02E-03
<i>IL32</i>	2,25	1.33E-05	0.001.04E-03
<i>IL34</i>	0,26	1.15E-11	4.08E-09
<i>IL36A</i>	38,31	0	0
<i>IL36G</i>	10,12	0	0
<i>IL36RN</i>	4,28	6.19E-13	2.74E-10
<i>IL37</i>	0,20	2.22E-15	1.49E-12
<i>IL4R</i>	2,94	7.61E-08	1.21E-05
<i>IL8</i>	16,31	2.50E-14	1.44E-11

В качестве ключевого цитокина, ассоциированного с псориазом, исследования последних лет в первую очередь рассматривают IL-17A (Krueger J.G. et al., 2012, Kirkham B.W. et al., 2014, Lonnberg A.S. et al., 2014). Этот

интерлейкин, продуцируемый Th17 в очаге поражения в больших количествах, оказывает непосредственное влияние на регуляцию экспрессии генов, участвующих во врожденном иммунитете – генов дефензинов, белков S100, липокалина и кателицидина, а также различных хемокинов CXCL, опосредующих миграцию нейтрофилов. Успех таргетной терапии, основанной на применении рекомбинантных антител к данному цитокину и его рецептору, подтверждает его роль в развитии данного заболевания.

Избыток IL-17 в очаге поражения также связан с активацией протеаз, которые участвуют в процессах созревания различных цитокинов, ростовых факторов и рецепторов (например, IGF, TGF, EGF, IL-6R, TNFR1, TNFR2 и других), а также в процессах деградации внеклеточного матрикса, коллагена, эластина, что способствует миграции иммунных клеток из кровяного русла в очаги поражения (Hua H. et al., 2011). Кератиноциты экспрессируют рецептор к IL-17 конститутивно (Albanesi C. et al., 1999), поэтому при его появлении в очаге быстро запускаются сигнальные каскады, активирующие транскрипционные факторы, связанные с воспалением, например, NFκB и AP-1. Это приводит к сверхэкспрессии генов-мишеней и активной продукции кератиноцитами провоспалительных белков: дефензинов, цитокинов и хемокинов, синтазы оксида азота (Рисунок 17).

На проанализированных образцах были идентифицированы изменения экспрессии генов цитокинов и хемокинов *IL17A*, *IL17F*, *IL1B*, *IL8*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL2*, *CCL7* (FC=3,29; 4,54; 6,49; 16,31; 23,74; 3,75; 2,54; 3,25, соответственно), а также генов *ICAM1*, *NOS2*, *HBD2*, *NGAL*; *MMP9*, *MMP1* (FC=2,24; 18,53; 33,29; 11,79; 3,21; 4,57, соответственно).

Подводя итоги анализа карт генных взаимодействий, можно сделать вывод о важном вкладе, который вносят в патогенез заболевания нарушения экспрессии генов в структурных клетках кожи. Учитывая «молекулярный шрам» и аномалии, присущие визуально непораженной коже больных псориазом, которые упомянуты

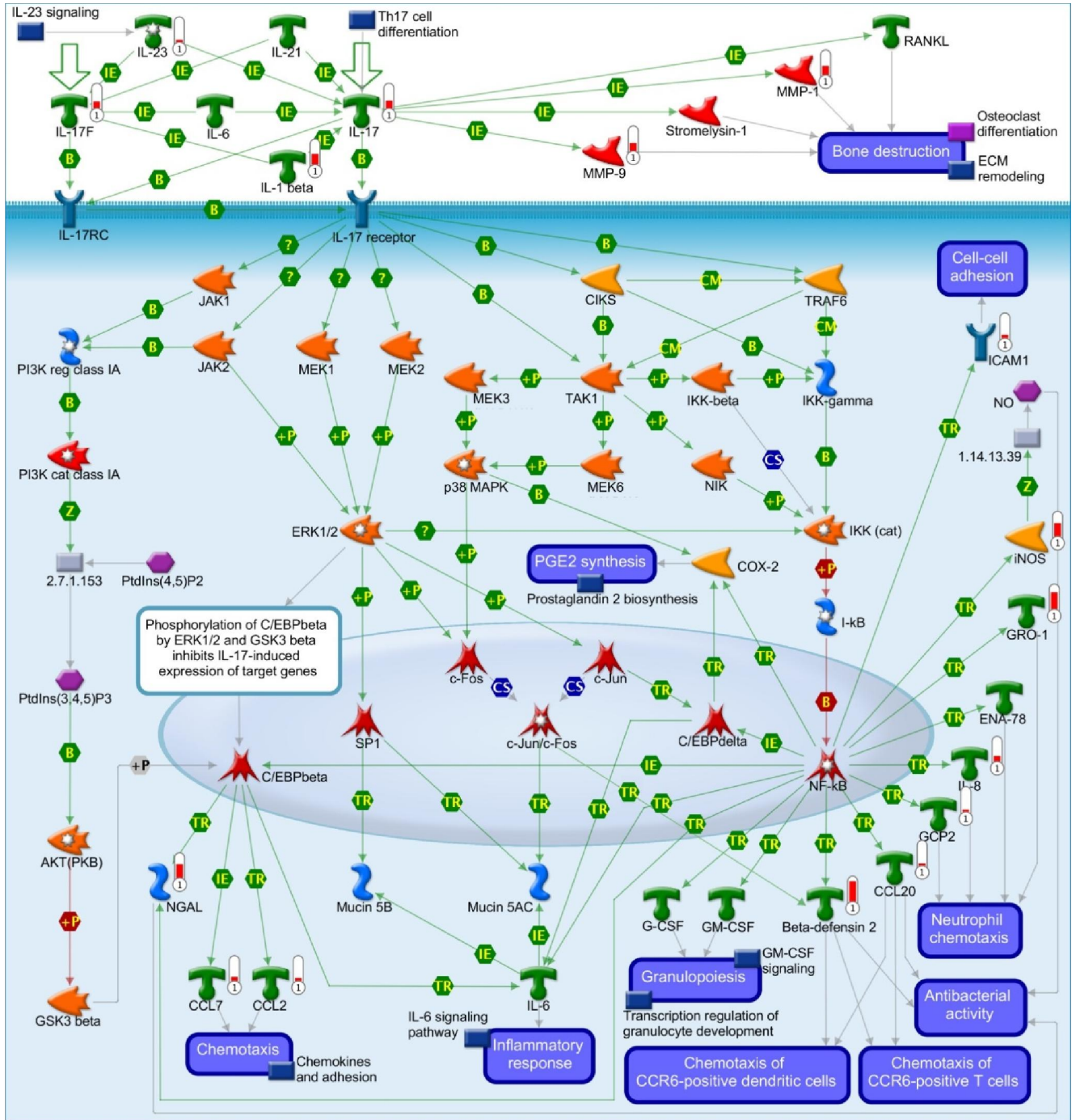


Рисунок 17. Карта генных взаимодействий сигнальных каскадов, индуцируемых цитокинами IL17/23.

в обзоре литературы, можно сделать вывод о вкладе структурных клеток кожи в предрасположенность к заболеванию и в патогенез псориаза. Идентификация ключевых регуляторов экспрессии, которые функционируют в кератиноцитах, не только необходима для лучшего понимания патогенеза псориаза, но и может быть использована для разработки более точных моделей заболевания *in vitro*.

3.5. Транскрипционный фактор AP-1 и его роль в развитии псориаза

В результате анализа сигнальных каскадов, связанных с изменениями кератиноцитов и структурно-функциональными изменениями эпидермиса, было выяснено, что одним из наиболее часто встречающихся регуляторов таких сигнальных каскадов является транскрипционный фактор AP-1. По итогам проведенного анализа можно выдвинуть гипотезу о том, что данный транскрипционный фактор является одним из центральных регуляторных звеньев, приводящих к появлению характерных псориазных повреждений на коже больных. Она поддерживается следующими фактами:

а) многие гены, активно экспрессирующиеся в кератиноцитах и важные для нормального функционирования эпидермиса (например, *IVL*, *LOR*, *FLG*, *KRT1,5,6,8,18,19* и другие), несут в промоторных областях сайт посадки AP-1;

б) некоторые из сайтов посадки AP-1 опосредуют изменения экспрессии этих генов в ответ на провоспалительное воздействие TPA (тетрафорбол ацетат) и изменения концентрации Ca^{++} ;

в) гены, кодирующие белки AP-1, по-разному экспрессируются в разных слоях эпидермиса и на различных стадиях дифференцировки кератиноцитов, и связаны с регуляцией пролиферации и дифференцировки кератиноцитов;

г) ультрафиолетовое излучение и повреждение тканей оказывают влияние на активность AP-1;

д) нокаут различных членов семейства в кератиноцитах мышей приводил к нарушениям гомеостаза эпидермиса – например, мыши, нокаутные по гену *JunB*, характеризовались увеличенной продукцией IL-6 и G-CSF в эпидермисе, образованием язв на коже и нарушенным ранозаживлением, а у мышей с индуцибельной инактивацией *Jun* и *JunB* в эпидермисе развивался псориазоподобный фенотип;

е) в коже при псориазе активизированы сигнальные каскады, содержащие в качестве регуляторного звена белки семейства AP-1 (Eckert R.L. et al., 2013).

Выдвинутая нами гипотеза о роли транскрипционного фактора AP-1 в патогенезе псориаза подтверждается исследованием Swindell с соавторами (Swindell W.R. et al., 2013), в котором были проанализированы промоторные области 709 гиперэкспрессированных в пораженной псориазом коже генов и была проведена оценка встречаемости сайтов связывания известных транскрипционных факторов (1209 мотивов, взятых из баз данных UniPROBE, Jaspar и TRANSFAC). Было выяснено, что промоторные области 709 ДЭГ с повышенной экспрессией были обогащены 27 мотивами, характерными для связывания различных транскрипционных факторов. При этом наибольшее количество (9 из 27) мотивов были ассоциированы со связыванием AP-1. Из них 1 мотив был характерен для связывания белка FRA1, 1 мотив – для связывания белка FOS и 7 - ассоциированы со связыванием AP-1 без детализации связывающихся субъединиц. Кроме того, гены, несущие в промоторных областях сайты посадки AP-1, сверхэкспрессированные по результатам анализа, характеризовались сходными изменениями экспрессии в опытах по обработке культивируемых кератиноцитов человека различными провоспалительными цитокинами (IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IL-17C, IL-36 α , IL-36 β , IFN- γ , TGF- α , TNF- α) (Swindell W.R. et al., 2013).

В проведенном нами полногеномном анализе на выбранном уровне значимости ни один из генов AP-1 не был достоверно дифференциально экспрессирован во всех образцах. Поскольку белки семейства осуществляют регуляцию в форме гомо- и гетеродимеров, при этом многие из них имеют близкие последовательности сайтов посадки и сходное воздействие на экспрессию генов-мишеней, вероятно, у разных больных регуляторные комплексы могут состоять из разных субъединиц, но при этом оказывать сходный регуляторный эффект на экспрессию генов-мишеней. Кроме того, регуляция активности самого транскрипционного фактора может осуществляться преимущественно не на уровне экспрессии, а на пост-транскрипционном уровне (путем различных модификаций, изменяющих стабильность белков и их

трансактивационный потенциал). Для проверки данного положения и верификации результатов полногеномного исследования было проведено сравнение с существующими в литературе данными, а также был выполнен более точный количественный анализ экспрессии генов AP-1 при помощи количественной ПЦР в реальном времени.

В исследовании Li et al, с которым проводилось сравнение в подразделе 3.1., стр 70, были идентифицированы достоверные изменения экспрессии генов *JUNB*, *JUND*, *FOS*, *FOSB*, *FRA1* (Таблица 11). При этом наибольшее количество прочтений (соответственно, наибольшую представленность мРНК в биопсиях) из семейства JUN имели гены *JUNB* и *JUND*, а из семейства FOS – *FOS* и *FRA1*. Основываясь на представленности мРНК транскриптов в пораженной псориазом коже, можно предположить, что наибольшее количество регуляторных комплексов AP-1 в пораженной псориазом коже состоит из белков JUNB и FRA1.

Таблица 11. Изменения экспрессии генов комплекса AP-1, идентифицированные в исследовании Li et. al.

Ген	Среднее кол-во прочтений в пораж. образце, RPKM	Среднее кол-во прочтений в непораж. образце, RPKM	Изменения экспрессии, Fold Change	p-value	Направления изменений экспрессии
<i>JUN</i>	14,35	19,37	0,74	2,08E-10	
<i>JUNB</i>	85,58	37,85	2,26	3,19E-22	повышена
<i>JUND</i>	32,03	54,84	0,58	2,01E-18	
<i>FOS</i>	11,31	23,13	0,49	2,00E-10	понижена
<i>FOSB</i>	2,59	1,67	1,55	8,99E-05	
<i>FOSL1</i>	7,35	0,77	9,51	3,26E-29	повышена
<i>FOSL2</i>	50,02	49,30	1,01	3,99E-01	

Общие направления изменения экспрессии AP-1, идентифицированные в работе Li et. al., сходны с изменениями, идентифицированными нами при полногеномном секвенировании, однако, вероятно, небольшая выборка проанализированных нами образцов не позволила выявить достоверные изменения экспрессии при помощи полногеномного секвенирования, так как из-за масштабов анализа и применения поправки на множественные сравнения

большое количество генов, характеризующихся небольшими изменениями экспрессии, могут быть отфильтрованы как недостоверные.

3.6. Оценка экспрессии генов AP-1 при псориазе

Учитывая ограничения метода полногеномного анализа, для проверки гипотезы о роли AP-1 в псориазическом процессе был проведен более точный анализ экспрессии его компонентов при помощи количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). На образцах пораженной и визуально непораженной кожи, взятых у 13 больных псориазом (выборка 2, Таблица 12) была проанализирована экспрессия различных членов семейства AP-1 - генов *JUN*, *JUNB*, *JUND*, *FOS*, *FOSB*, *FRA1* и *FRA2* (Рисунок 18).

Таблица 12. Информация о пациентах, биопсии которых вошли в выборку 2.

№	Пол	Возраст	PASI	Наследственность
1	М	22	4.0	отрицает
2	М	36	7.2	псориаз у отца
3	М	23	1.8	псориаз у брата и отца
4	М	51	9.4	псориаз у матери
5	М	38	2.1	отрицает
6	М	57	4.2	псориаз у отца
7	М	51	2.1	отрицает
8	М	40	2.8	псориаз у отца
9	М	34	3.2	псориаз у матери
10	М	49	11.4	отрицает
11	М	29	8.2	псориаз у отца
12	М	33	4.1	отрицает
13	М	55	2.7	псориаз у матери

Полученные данные анализировали при помощи метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ (сравнительный C_T -метод для относительного количественного анализа) (Livak K.J. et al., 2001). Данный метод позволяет оценивать относительную представленность транскриптов в разных вариантах опыта, например, изменения экспрессии целевого гена в пораженном образце по сравнению с непораженным образцом кожи больных псориазом. При 5% уровне значимости из проанализированных генов AP-1 только ген *FRA1* характеризовался достоверно повышенной экспрессией в пораженной коже относительно визуально

непораженной кожи одних и тех же больных (Рисунки 18 и 19). Экспрессия других генов AP-1 не была достоверно изменена на 5% уровне значимости (Рисунок 18).

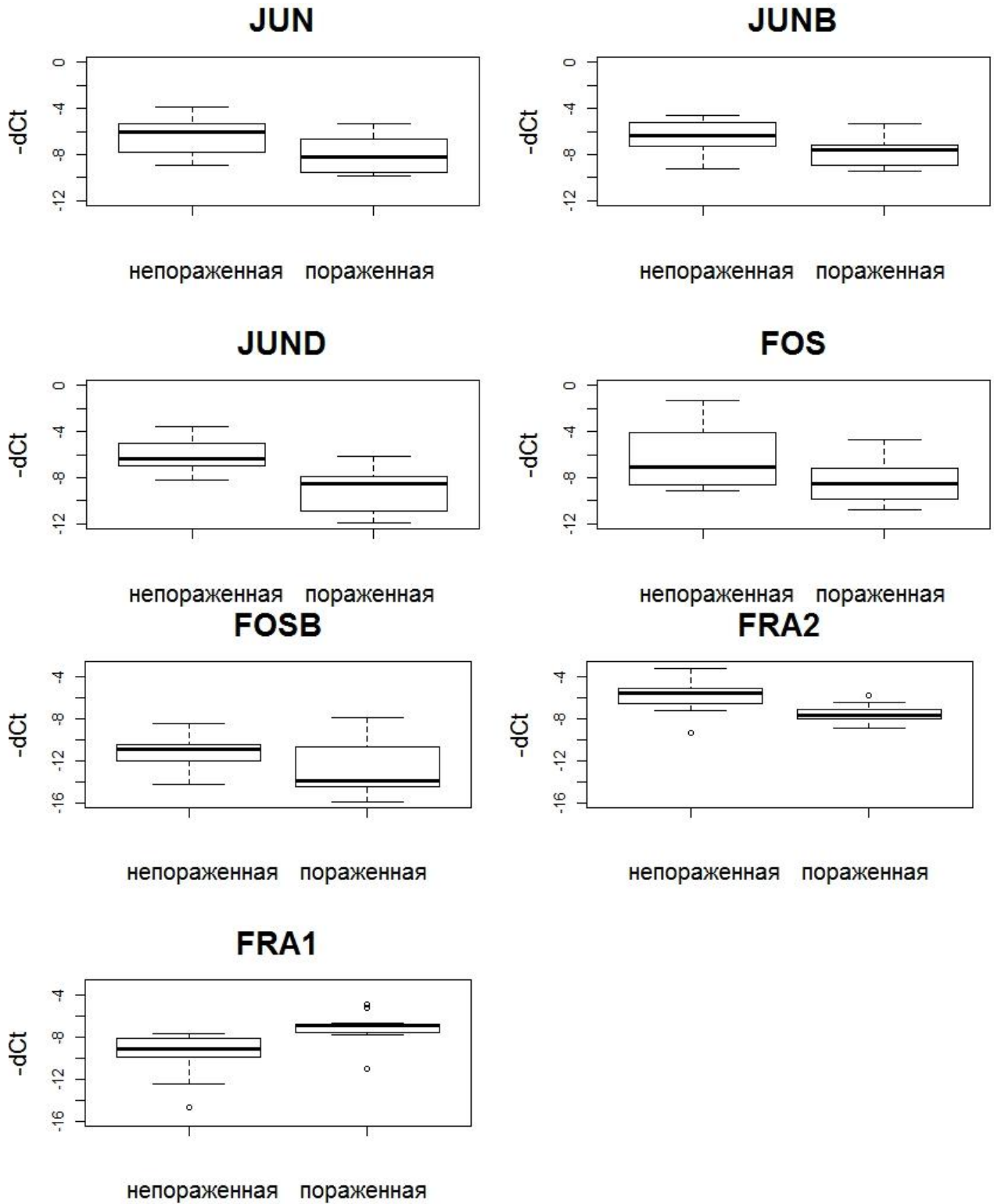


Рисунок 18. Сравнительная оценка изменений экспрессии генов семейства AP-1 в пораженной и визуально непораженной коже больных (выборка 2, n=13).

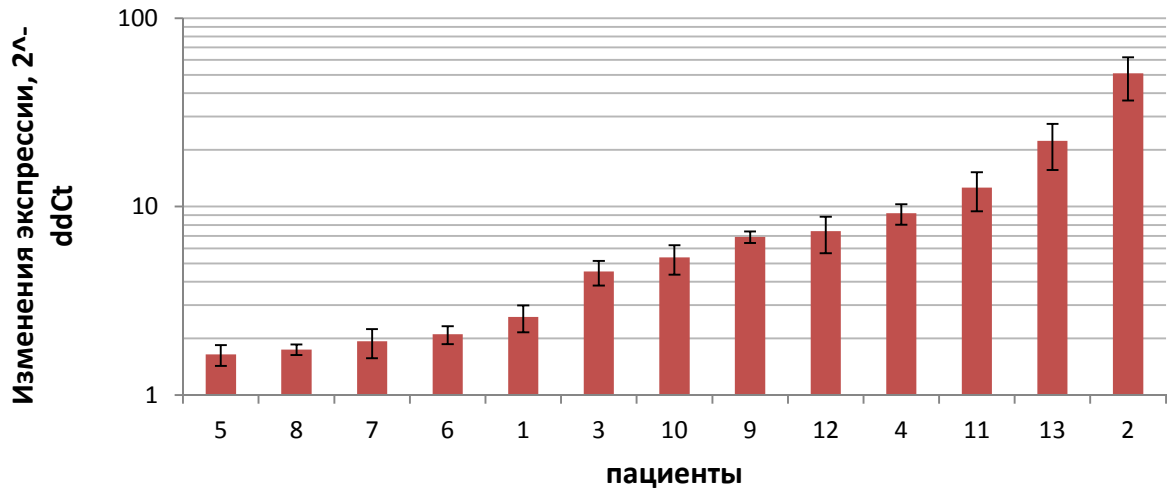


Рисунок 19. Сравнительная оценка изменений экспрессии гена *FRA1* в пораженной псориазом коже относительно визуально непораженной кожи больных (выборка 2, $n=13$) ($p<0,05$).

Для подтверждения достоверности идентифицированных изменений экспрессии была проанализирована экспрессия гена *FRA1* еще на 10 парах образцов пораженной и визуально непораженной кожи больных псориазом (Рисунок 20). Дополнительный анализ подтвердил сверхэкспрессию *FRA1*, которую можно наблюдать в пораженной псориазом коже при сравнении ее с визуально непораженной кожей тех же больных (общий объем проанализированной выборки составил 23 пары биопсий).

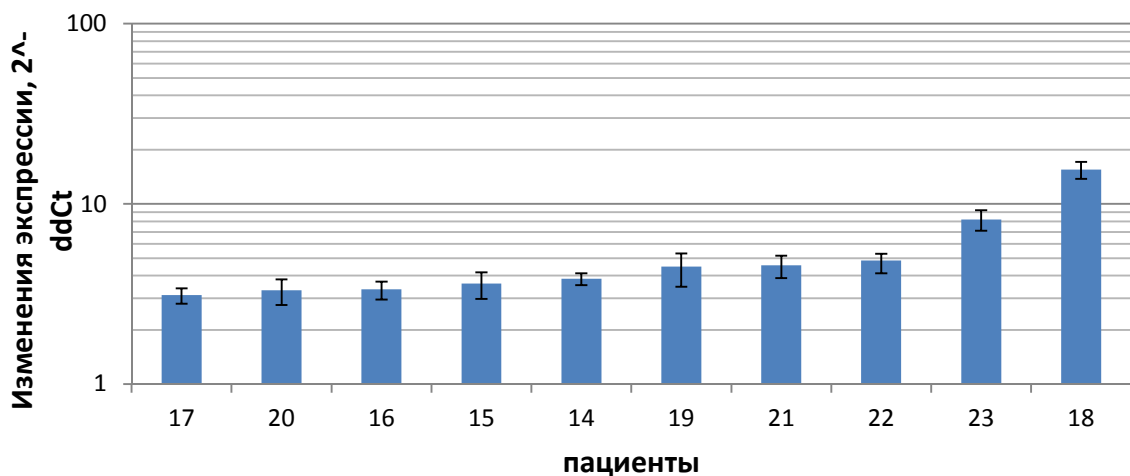


Рисунок 20. Сравнительная оценка изменений экспрессии гена *FRA1* в пораженной псориазом коже относительно визуально непораженной кожи больных (выборка 3, $n=10$), ($p<0,05$).

Таким образом, оценка экспрессии *FRA1* может применяться в качестве маркера при разработке моделей псориазоподобного воспаления. Кроме того, достоверная сверхэкспрессия *FRA1* во всех проанализированных образцах, а также информация об изменениях генов-мишеней *FRA1*, полученная в результате полногеномного секвенирования, позволяют выдвинуть предположение о том, что среди белков семейства FOS преимущественную роль в патогенезе псориаза играет именно *FRA1*.

3.7. Оценка накопления белка *FRA1* в пораженной псориазом коже

Так как изменения на уровне мРНК не всегда приводят к изменениям на уровне белка (в среднем примерно 40% вариации в концентрации белка может быть объяснено изменениями в количестве мРНК (Vogel C. et al., 2012), при помощи иммуногистохимического окрашивания была проведена оценка накопления белкового продукта *FRA1* в коже больных псориазом (Рисунок 21). Биопсии из пораженных и визуально непораженных участков кожи больных псориазом фиксировали в формалине с последующей заливкой в парафиновые блоки, приготовлением микросрезов и окрашиванием эозином и гематоксилином/антителами (подробнее – в разделе Материалы и методы). Поскольку для стабилизации *FRA1* необходимо его фосфорилирование, была проведена оценка накопления как нефосфорилированной, так и фосфорилированной форм белка в пораженной и визуально непораженной коже больных. На рисунке 21 можно наблюдать накопление обеих форм белка во всех слоях эпидермиса пораженной псориазом кожи, при этом нефосфорилированная форма больше всего накапливается в кератиноцитах базального слоя, чего нельзя с уверенностью утверждать про фосфорилированную форму белка. Не наблюдалось накопления *FRA1* в клетках воспалительного инфильтрата, что подтверждает предположение о преимущественной роли кератиноцитов как основного источника *FRA1* в пораженной псориазом коже.

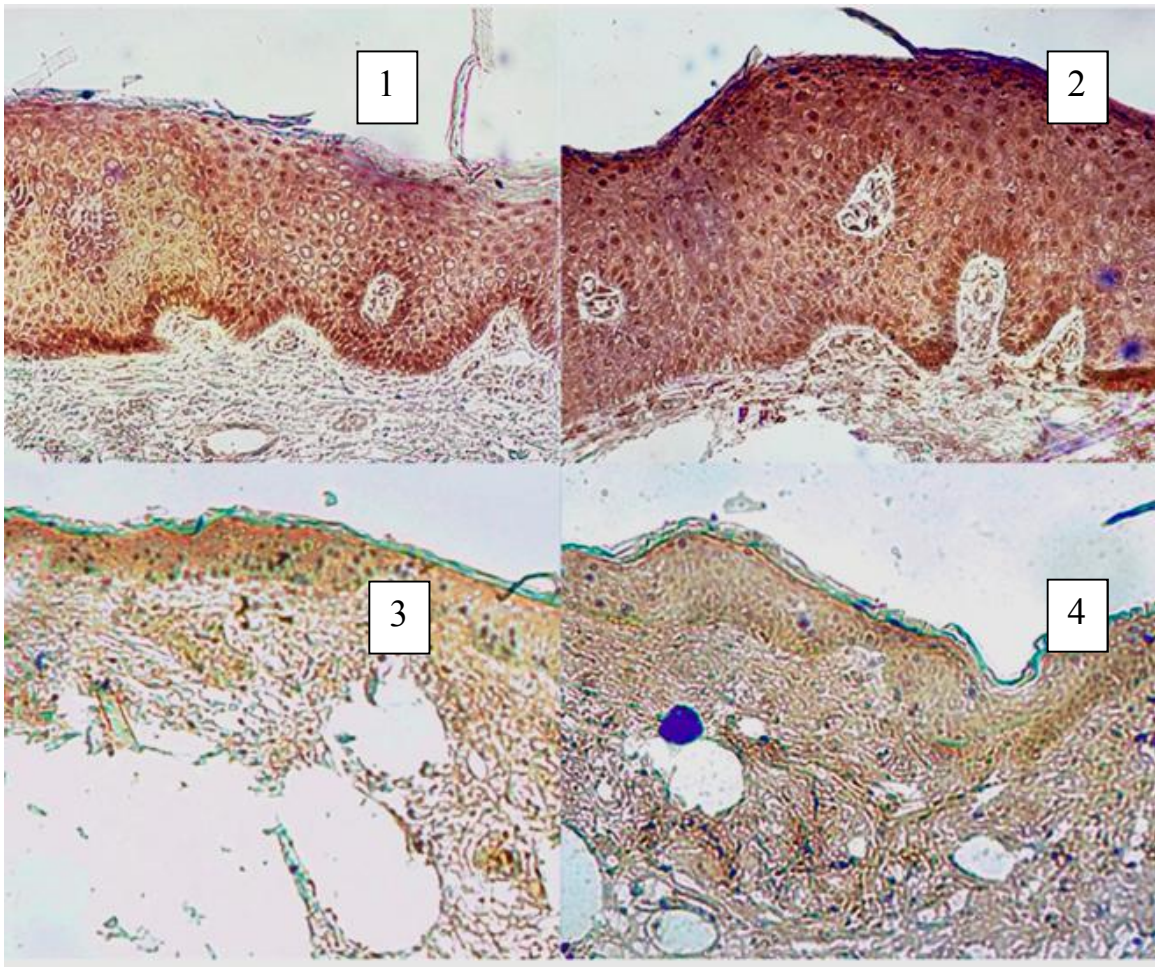


Рисунок 21. Иммуногистохимическое окрашивание срезов биопсий пораженной (1,2) и визуально не пораженной (3,4) псориазом кожи. 1,3 – антитела на нефосфорилированную форму FRA1 Novus Biologicals #NBP1-47757; 2,4 – антитела на фосфорилированную форму FRA1 Cell Signaling #5841.

По результатам анализа изменений экспрессии и накопления белкового продукта *FRA1* при псориазе можно выдвинуть предположение, что именно данный белок является основным компонентом гетеродимеров AP-1 в пораженной псориазом коже, и aberrантная активация его гена и накопление белкового продукта приводят к изменению экспрессии генов-мишеней и соответствующим проявлениям, характерным для псориаза. Поскольку потенциал трансактивации *FRA1* гораздо слабее, чем у белков FOS и FOSB, преимущественное включение *FRA1* в димеры с белками JUN может приводить к снижению суммарной регуляторной активности димеров. Все это может ослаблять противовоспалительную активность JUN и вместе с повышением

экспрессии собственных мишеней FRA1 приводит к развитию псориатического поражения тканей.

3.8. Роль регуляции FRA1 и его гены-мишени

Для оценки влияния, который FRA1 оказывает на патологический процесс, в списках ДЭГ были выявлены потенциальные мишени FRA1 (Таблица 13). Были отобраны гены, для которых в литературных источниках FRA1 был выявлен в качестве одного из регуляторов экспрессии, и белковые продукты которых участвовали в сигнальных каскадах, ассоциированных с развитием псориаза.

Таблица 13. Информация о генах-мишенях FRA1 на основе анализа данных литературных источников.

Ген	Изменения экспрессии, FC	p-value	FDR	Источник
<i>MMP9</i>	3.21	1.17E-04	3.65E-08**	(Kent L.N. et al., 2011, Delgado-Olguin P. et al., 2014)
<i>MMP12</i>	5.39	1.89E-10	2.34E-06**	(Wu L. et al., 2003)
<i>CCL22</i>	2.71	7.41E-08	3.27E-05**	(Finzer P. et al., 2000)
<i>HMOX1</i>	2.60	1.74E-08	9.45E-05**	(Vaz M. et al., 2012)
<i>CCNA2</i>	2.07	8.61E-06	0.008.29E-03**	(Casalino L. et al., 2007)
<i>PLAUR</i>	2.41	7.06E-035	0.01*	(Jamaluddin M.S., 2006, Leupold J.H. et al., 2007)
<i>CCND1</i>	0.62	2.96E-03	0.13	(Klein E.A. et al., 2008)
<i>MGP</i>	0.62	3.79E-03	0.15	(Eferl R. et al., 2004, Julien M. et al., 2009)
<i>IVL</i>	2.32	1.06E-03	0.72	(Welter J.F. et al., 1995)
<i>MMP1</i>	4.57	1.95E-03	0.91	(Newberry E.P. et al., 1997, Bidder M. et al., 2000)

Из приведенной таблицы для дальнейшего анализа выбирали гены, связанные с развитием воспаления и относящиеся к разным сигнальным каскадам, описанным в разделе 5.4. В анализ вошли гены матриксных металлопротеаз *MMP1*, *MMP9*, *MMP12*, хемоаттрактанта *CCL22/MCP1*, гемоксигеназы *HMOX1*, циклина A2 *CCNA2*, урокиназного рецептора *PLAUR/CD87*, матриксного Gla-белка *MGP* (Таблица 14).

Таблица 14. Информация о генах-мишенях FRA1, включенных в анализ.

Ген	Описание и функции гена
<i>MMP1</i>	Ген кодирует интерстициальную протеиназу, которая обладает активностью в отношении коллагена I, II и III типов и характеризуется повышенной экспрессией при псориазе в пораженной коже, а также в сыворотке крови. После PUVA-терапии экспрессия <i>MMP1</i> снижается (Mezentsev A. et al., 2014). Активность данного фермента связана с мобилизацией фибробластов и кератиноцитов, что обуславливает ее важную роль в заживлении ран (Stevens L.J. et al., 2012)
<i>MMP9</i>	Данная металлопротеаза экспрессируется кератиноцитами, а также различными иммунными клетками, например: лимфоцитами, макрофагами, тучными клетками. Она участвует в активации IL1 и плазмينا, а также в процессах ремоделирования тканей и заживления ран. При псориазе наблюдается повышенная экспрессия MMP9 в пораженных тканях и в плазме крови больных (Mezentsev A. et al., 2014). После успешного лечения псориаза блокаторами TNF, например, этанерцептом и инфликсимабом, экспрессия быстро снижается. При культивации эксплантов, полученных из кожи больных псориазом, наблюдалось значительное накопление данного фермента в культуральной жидкости (Mezentsev A. et al., 2014).
<i>MMP12</i>	MMP12 осуществляет деградацию эластина, коллагена типа IV, фибронектина, ламинина 1, энтактина, витронектина, протеогликанов, участвует в активации MMP2 и 3. Кроме того, фермент участвует в макрофаг-опосредованном протеолизе и разрушении базальной мембраны. При псориазе наибольшее увеличение экспрессии наблюдается в иммунных клетках, инфильтрирующих папиллярную дерму. В пораженной коже экспрессия увеличена в 17 раз по сравнению с визуально непораженной кожей тех же больных (Mezentsev A. et al., 2014).
<i>CCL22/ MCP1</i>	Данный хемокин осуществляет хемоаттрактивную функцию в отношении клеток, экспрессирующих рецептор CCR4 (макрофагов, лимфоцитов, в том числе регуляторных Т-клеток и резидентных Т-лимфоцитов кожи, НК-клеток). Продукция CCL22 связана с активацией Th2-опосредованного воспаления, поэтому его уровни повышены при atopическом дерматите. Тем не менее, при псориазе также наблюдается повышение экспрессии данного хемокина, что

	<p>может объясняться его продукцией кератиноцитами с последующей активацией Т лимфоцитов по Th17 пути (Kusumoto S. et al., 2014).</p>
<i>HMOX1</i>	<p>Микромомальная гемоксигеназа HMOX1 осуществляет окислительное расщепление гема в ходе его деградации. Данный фермент сверхэкспрессирован при псориазе в кератиноцитах гиперпролиферирующего эпителия и в клетках иммунного инфильтрата, а также при других воспалительных заболеваниях, сходных с псориазом. HMOX1 обладает антиокислительной и цитопротекторной функцией при окислительном стрессе и общей противовоспалительной активностью, однако его роль в патогенезе псориаза до сих пор не совсем ясна. Одна из гипотез, проверенная на модели экспериментального язвенного колита, заключается в том, что противовоспалительная функция фермента может реализовываться только при индукции его экспрессии до начала воспаления (Hanselmann C. et al., 2001, Wojas-Pelc A. et al., 2007). Кроме того, поскольку данный фермент участвует в процессах неоваскуляризации, его роль в патогенезе заболевания может быть связана с разрастанием сосудистой сети, наблюдаемым при псориазе (Grochot-Przeczek A. et al., 2010).</p>
<i>CCNA2</i>	<p>CCNA2 является членом высококонсервативного семейства циклинов, члены которого характеризуются различными паттернами экспрессии в зависимости от этапа клеточного цикла. Циклины функционируют в качестве регуляторов циклин-зависимых киназ, приводя к переходу клеток между разными периодами клеточного цикла. Циклин A2 образует комплексы с циклин-зависимыми киназами 1 и 2 и контролирует переход клеток из фазы G₁ в S фазу и из фазы G₂ в митоз, что может объяснять его роль в регуляции гиперпролиферации эпидермальных кератиноцитов при псориазе (Manczinger M. et al., 2013). Кроме того, он может играть роль в реорганизации цитоскелета и миграции клеток (Arsic N. et al., 2012).</p>
<i>PLAUR/C D87</i>	<p>Ген кодирует урокиназный рецептор, также известный как CD87, который также связывает белки внеклеточного матрикса (интегрины и витронектин). Он играет роль в процессах миграции и пролиферации клеток, а также в клеточной адгезии и ремоделировании внеклеточного матрикса (Leupold J.H. et al., 2007).</p>
<i>MGP</i>	<p>Остеокальцин, матриксный GLA-белок, - это минерал-связывающий внеклеточный белок, который экспрессируется, в первую очередь, в остеокластах и других клетках костной ткани и связан со снижением риска сердечно-сосудистых заболеваний, а также риска развития псориатического артрита у</p>

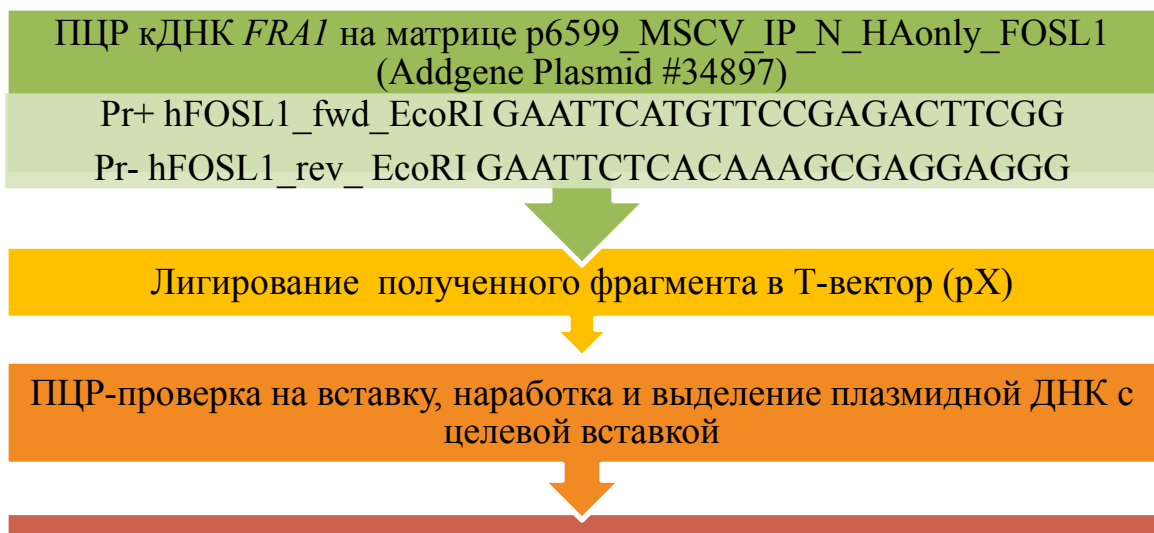
больных псориазом. Данный белок ингибирует минерализацию и защищает гладкомышечные клетки сосудов от кальцификации. Уровень данного белка в плазме у больных псориазом повышен, что может играть роль в защите клеток сосудов от циркулирующих провоспалительных агентов (Gerdes S. et al., 2014).

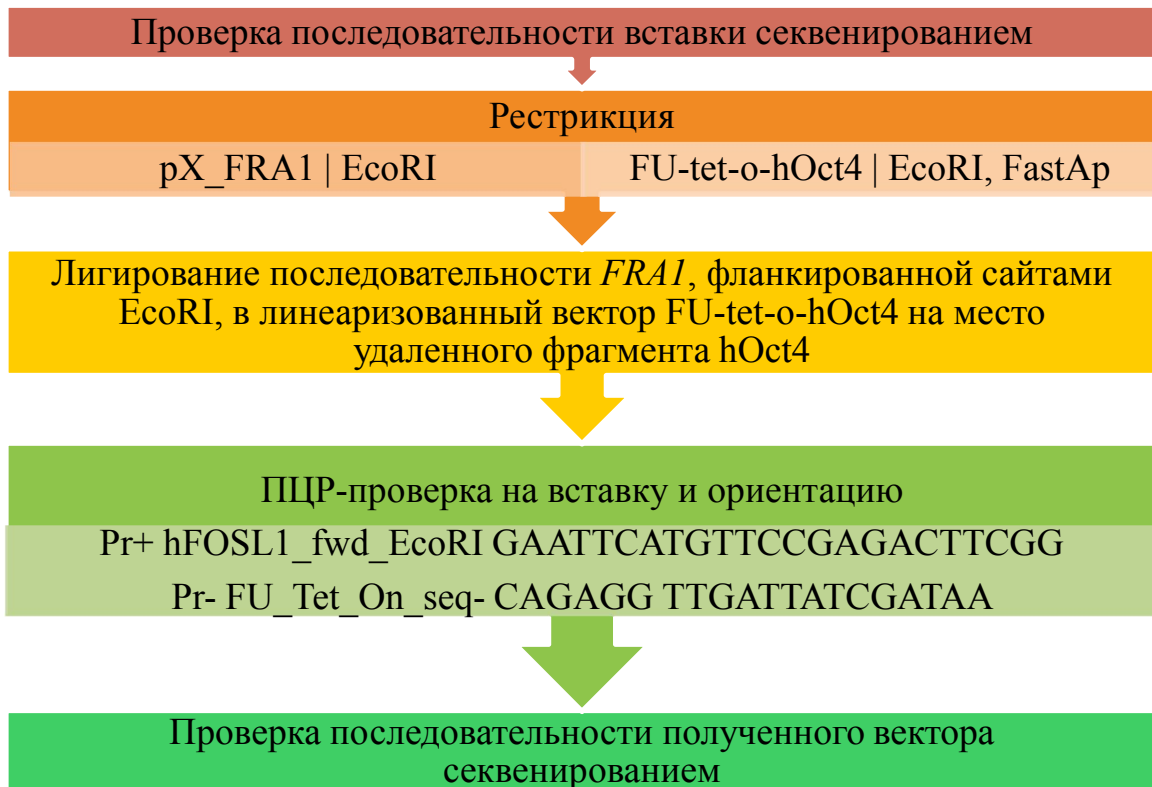
Далее для оценки регуляторного влияния *FRA1* на перечисленные гены были созданы конструкции для сверхэкспрессии и для подавления экспрессии *FRA1* в клетках млекопитающих.

3.9. Изменения экспрессии мишеней при сверхэкспрессии *FRA1*

Сверхэкспрессия *FRA1* осуществлялась при помощи индуцибельной системы на основе модифицированной Tet-on Dox-системы (Urlinger S. et al., 2000). Существует два варианта индуцибельной Dox-системы: “Tet-off”, в которой при воздействии доксициклином целевой ген перестает экспрессироваться, и “Tet-on”, в которой при воздействии доксициклином (Dox) целевой ген начинает экспрессироваться. В данной работе использовалась Tet-on система. Для минимизации нецелевой экспрессии гена без индукции («подтекания» промотора) применялась система из двух векторов, в которой экспрессия гена-мишени (*FRA1*) зависела от активности индуцибельного трансактиватора (rtTa).

На первом этапе были созданы конструкции для индуцибельной сверхэкспрессии *FRA1* по следующей схеме:





Более подробно создание конструкций для индуцибельной сверхэкспрессии *FRA1* описано в разделе «Материалы и методы».

Для индуцибельной сверхэкспрессии была использована система из двух векторов: FU-tet-o-*FRA1*, несущего вставку целевого гена *FRA1* под индуцибельным промотором с сайтом TRE (tetracycline-response element), и вектора FUdeltaGW-rtTA-IRES-puro, являющегося модификацией вектора FUdeltaGW-rtTA несущего вставку rtTA под

Сборку и наработку вирусных частиц проводили в клетках линии HEK-293T, затем клетки линии HaCaT трансформировали путем одновременного заражения двумя лентивирусными конструкциями с последующим отбором стабильных трансфектантов на антибиотике пурамицине. Подробнее создание клеточной линии HaCaT со сверхэкспрессией *FRA1* описано в разделе «Материалы и методы».

Клетки HaCaT, в которых ген *FRA1* экспрессировался под индуцибельным промотором, выращивали на среде с доксициклином (1мкг/мл) и пурамицином (0,5 мкг/мл) в течение 48, 72 или 96 часов, после чего при помощи количественной ПЦР в реальном времени в них оценивали экспрессию *FRA1*

(Рисунок 22) и его мишеней (Рисунок 23, приведены данные для тех генов-мишеней, которые характеризовались достоверными изменениям экспрессии). В качестве контроля оценивали экспрессию в тех же клетках без индукции доксициклином. Все эксперименты проводили в пятикратной повторности.

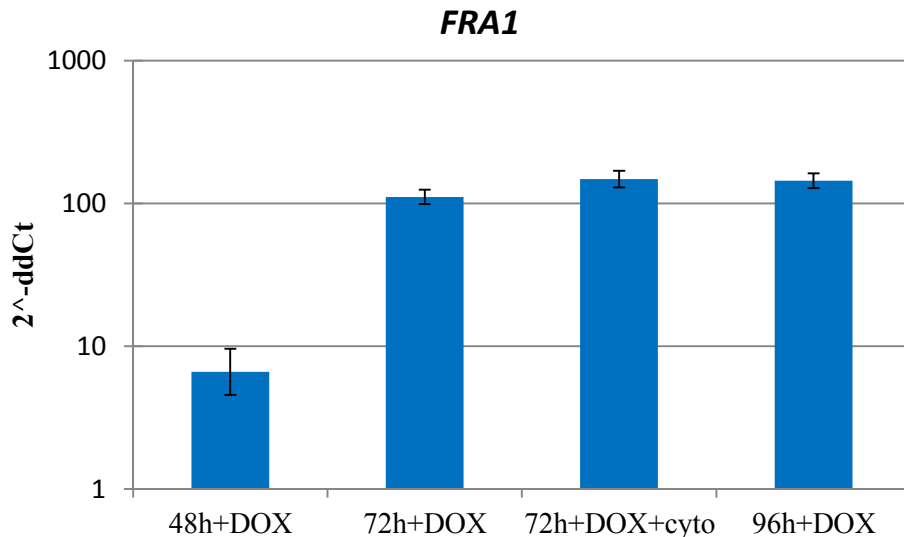


Рисунок 22. Изменения экспрессии *FRA1* в трансформированных клетках при индукции доксициклином (DOX) в течение 48 часов (48h+DOX), 72 часов (72h+DOX), 96 часов (96h+DOX), 72 часов в индукцией доксициклином и провоспалительными цитокинами (72h+DOX+cyto) ($p < 0,05$).

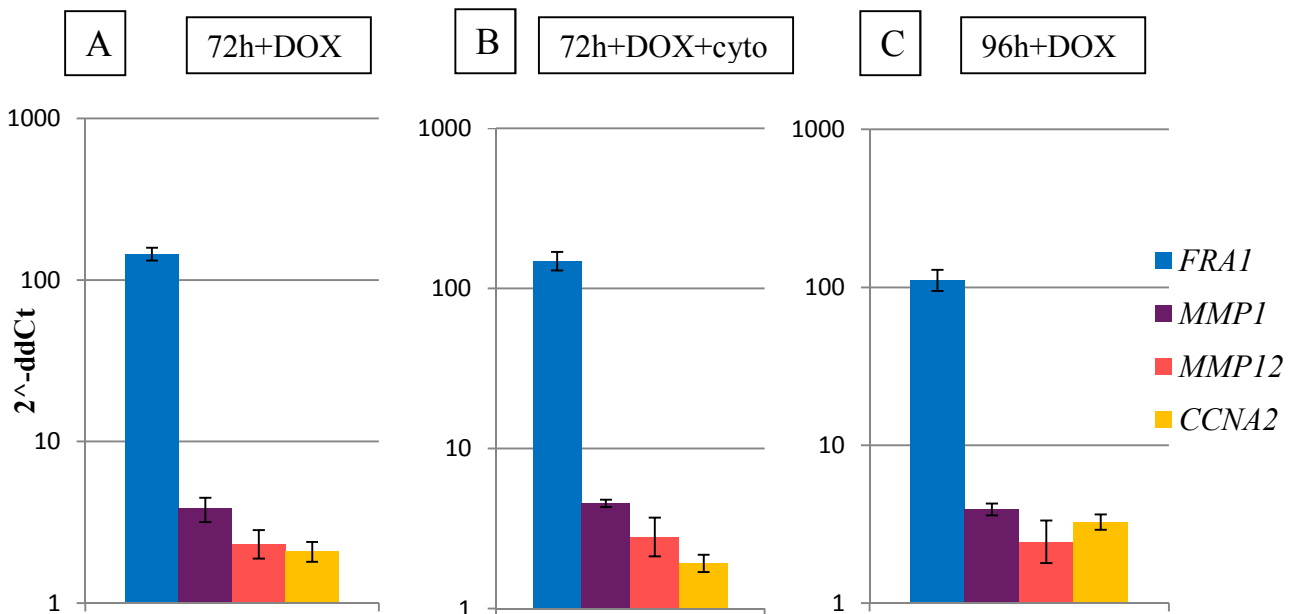


Рисунок 23. Достоверные изменения экспрессии генов-мишеней *FRA1* в трансформированных клетках при индукции доксициклином в течение 72 часов (A), 96 часов (C), 72 часов в индукцией доксициклином и провоспалительными цитокинами (B), ($p < 0,05$).

Пролиферативные и морфологические характеристики трансформированных клеток HaCat при обработке доксициклином не изменялись достоверно, что может обуславливаться иммортализованностью исходной клеточной линии.

Поскольку изменения экспрессии не всегда сочетаются с изменениями наработки белка, была проведена оценка изменений накопления белка FRA1 в трансформированных клетках под воздействием доксициклина (Рисунок 24).

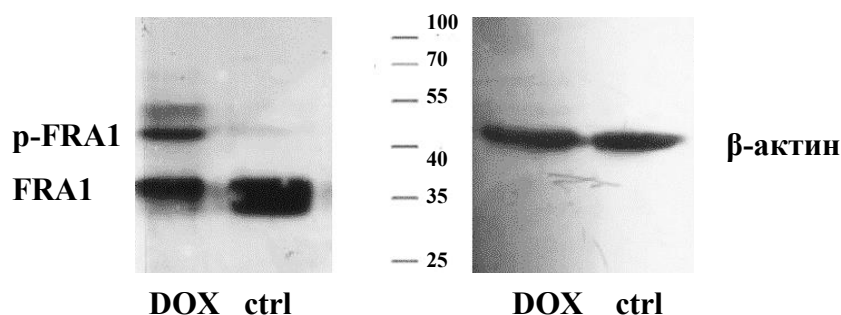


Рисунок 24. Оценка накопления белка FRA1 в трансформированных клетках при индукции доксициклином. DOX – обработка трансформированных клеток доксициклином, ctrl – трансформированные клетки без индукции доксициклином. Используются антитела на фосфорилированную форму FRA1 Cell Signaling #5841, на бета-актин Cell Signaling #4970.

Оценка накопления нефосфорилированной и фосфорилированной форм белка показала, что в трансформированных клетках под воздействием доксициклина накапливалось большее количество фосфорилированной формы белка, при том, что в контрольных клетках присутствовало большее количество нефосфорилированного белка.

По результатам проведенного анализа экспрессии достоверные изменения экспрессии *FRA1* наблюдались уже через 48 часов после индукции, а изменения экспрессии генов мишеней наблюдались, начиная с временной точки в 72 часа. Поскольку нас интересовала роль FRA1 в контексте воспаления, была добавлена точка 72 часа с обработкой провоспалительными цитокинами (TNF- α , 25 нг/мл, IFN- γ , 10 нг/мл, IL-17, 100 нг/мл). Среди всех проанализированных генов-мишеней FRA1, перечисленных в таблице 15, достоверными изменениями экспрессии характеризовались гены *MMP1*, *MMP12* и *CCNA2* ($p < 0.05$).

Добавление цитокинов повышало экспрессию матриксных металлопротеаз *MMP1* (изменения экспрессии составили 3.94 раза без цитокинов и 4.56 раз с цитокинами) и *MMP12* (изменения экспрессии составили 2.44 и 2.80 раз, соответственно) и снижало экспрессию гена циклина A2 (изменения экспрессии составили 3.25 и 1.92 раз, соответственно).

3.10. Изменения экспрессии мишеней при ингибировании *FRA1*

Следующим шагом стал эксперимент по ингибированию экспрессии *FRA1* в клетках линии *HaCaT* при помощи РНК-интерференции. Доставку малых интерферирующих РНК в клетки осуществляли при помощи трансфекции липидным агентом (подробнее – в разделе Материалы и методы).

На первом этапе работы провели оптимизацию протокола трансфекции клеток *HaCaT* для получения максимальной эффективности трансфекции клеток малыми интерферирующими РНК. Была использована siRNA (ДНК-Синтез), направленная к последовательности гена *GAPDH* и несущая флуоресцентную метку, благодаря которой была возможна визуальная оценка эффективности трансфекции. Опыты проводились на 6-ти луночной планшете (V культуральной среды – 2 мл) в трехкратной повторности (Таблица 15, Рисунок 25).

Таблица 15. Соотношения siRNA/липидный агент, которые применялись при отработке методики трансфекции клеток *HaCaT*.

	Лунка 1	Е, %	Лунка 2	Е, %	Лунка 3	Е, %
siRNA	1 мкл	<5%	2.5 мкл	30-35%	5 мкл	55-60%
Metafectene Pro	1 мкл		3 мкл		7 мкл	
	Лунка 4	Е, %	Лунка 5	Е, %	Лунка 6	Е, %
siRNA	10 мкл	75-85%	15 мкл	Высокое кол-во мертвых клеток	PBS	0
Metafectene Pro	15 мкл		30 мкл		PBS	

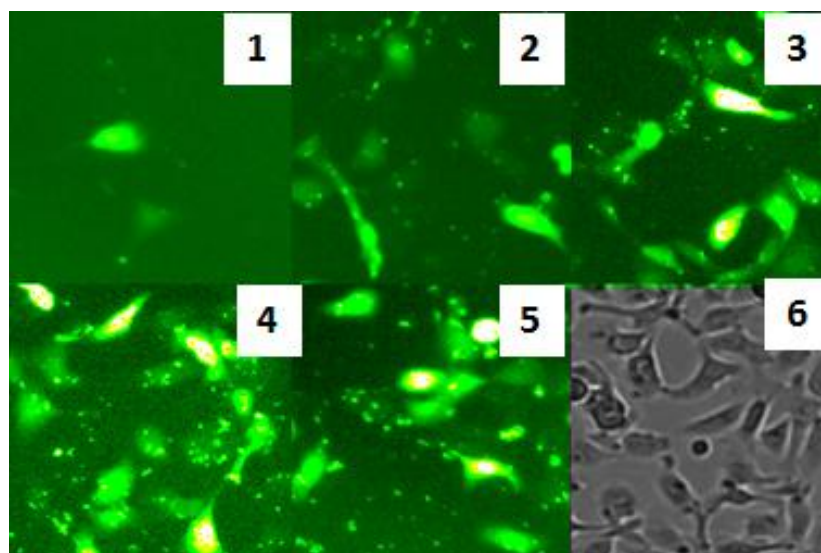


Рисунок 25. Флуоресцентная визуализация клеток HaCat, трансфицированных siRNA в количествах, указанных в таблице 4.

Для дальнейших опытов использовали соотношение 10 мкл siRNA на 15 мкл трансфицирующего агента, которое по результатам опытов давало выход ~ в 70-80% трансфицированных клеток.

На следующем этапе при помощи приложения BLOCK-iT™ RNAi Designer были подобраны последовательности малых интерферирующих РНК, направленные к кодирующим последовательностям гена.

Таблица 16. Характеристики малых интерферирующих РНК для ингибирования экспрессии *FRA1*.

Название	Последовательность
siRNA1-F siRNA1-R	GGAUGGUACAGCCUCAUUUdTdT AAAUGAGGCUGUACCAUCCdTdT
siRNA1-F siRNA1-R	GGAAGGAACUGACCGACUUdTdT AAGUCGGUCAGUUCCUCCdTdT
siRNA1-F siRNA1-R	GGAGACUGACAAACUGGAAdTdT UCCAGUUUGUCAGUCUCCdTdT

После трансфекции и инкубации в течении 48 часов методом qPCR оценивали эффективность ингибирования экспрессии *FRA1*. Было выявлено, что максимально стабильное ингибирование наблюдалось в варианте siRNA1 (Рисунок 26).

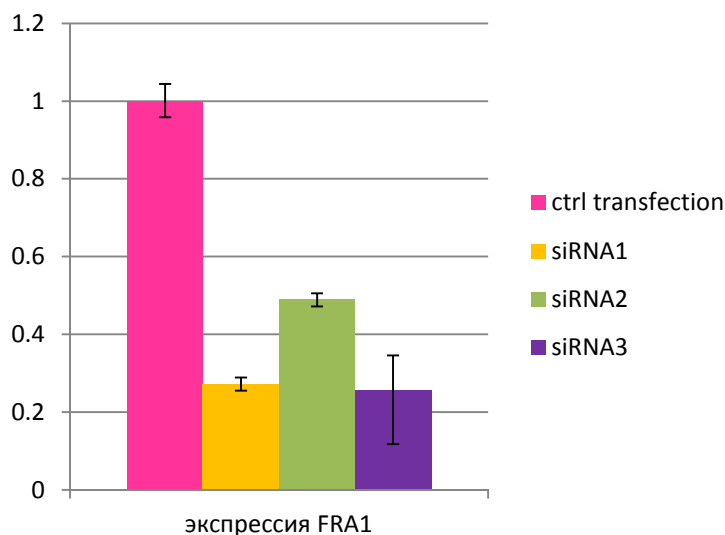


Рисунок 26. Остаточные уровни экспрессии FRA1 в зависимости от последовательности siRNA. Данные по трем siRNA, оценка экспрессии относительно контроля (ctrl transfection, обработка трансфецирующим агентом)

Для дальнейших опытов использовали siRNA1 и соответствующую контрольную siRNA (“scrambled” siRNA), которая состояла из тех же нуклеотидов, что siRNA1, расположенных в произвольном порядке (подробнее – в разделе «Материалы и методы»). Трансфекция контрольной siRNA не приводила к достоверным изменениям экспрессии *FRA1*.

Следующим шагом стала оценка изменения экспрессии выбранных генов-мишеней FRA1 под воздействием siRNA (Рисунок 27). Обработку проводили по двум временным точкам (48 и 72 часа). Было выявлено, что достоверными изменениями экспрессии характеризовались те же мишени, что и при сверхэкспрессии *FRA1*. Кроме того, при ингибировании *FRA1* снижалась экспрессия гена *PLAUR*, однако, изменения не были достоверны на выбранном уровне значимости ($p < 0.05$).

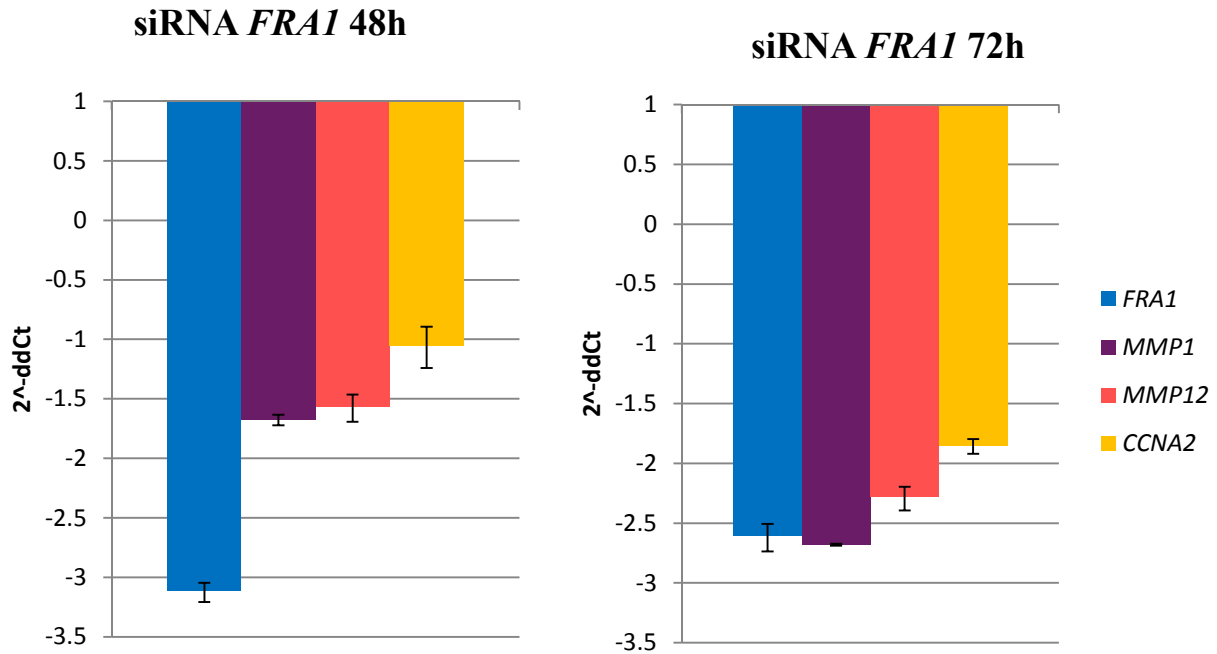


Рисунок 27. Ингибирование экспрессии мишеней *FRA1*, временные точки 48 и 72 часа. Данные относительно контроля (“scrambled” siRNA).

Проведенные опыты показали, что из всех выбранных генов-мишеней достоверными изменениями экспрессии в ответ на сверхэкспрессию и ингибирование *FRA1* характеризовались только гены матриксных металлопротеаз *MMP1* и *MMP12*, а также циклин-зависимой киназы *CCNA2*. Такие результаты могут обуславливаться несколькими факторами:

- специфичностью экспрессии в разных типах клеток. Поскольку опыты проводились на культуре спонтанно иммортализованных кератиноцитов, гены, которые в норме характеризуются низкими уровнями базальной экспрессии в кератиноцитах, могли достоверно не изменять свою экспрессию в ответ на увеличение или уменьшение экспрессии *FRA1*. При этом изменения экспрессии этих генов при псориазе могут обуславливаться изменениями клеточного состава в области псориатического поражения;

- различными уровнями метилирования. Уровни метилирования генов в коже и в клеточной линии, на которой проводились опыты, могут различаться достаточно сильно, что, в свою очередь, может приводить к различиям в уровнях экспрессии. При этом различия в уровнях метилирования могут иметь больший

регуляторный потенциал, чем изменения экспрессии *FRA1*, достигнутые в данной работе;

- различными уровнями экспрессии возможных белковых партнеров *FRA1*. Несмотря на обработку цитокинами, моделирующую псориазоподобное воспаление, в клетках HaCaT в условиях проведения опыта могли наблюдаться другие соотношения потенциальных белковых партнеров *FRA1*, нежели в коже при псориазе. Кроме того, возможно, для связывания *FRA1* с промоторами необходимы модификации или активация сигнальных каскадов, которых не наблюдалось в условиях проведения экспериментов.

Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили роль *FRA1* как регулятора транскрипции генов матриксных металлопротеаз и циклина A2 в кератиноцитах, а также выдвинутую гипотезу 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.

Внеклеточный матрикс – это динамичная структура, которая является основным компонентом клеточного микроокружения и постоянно подвергается ремоделированию. Гомеостаз внеклеточного матрикса является необходимым условием для правильного морфогенеза, ангиогенеза, ремоделирования костей, заживления ран и поддержания нормального гомеостаза тканей. Ремоделирование внеклеточного матрикса является важным механизмом регуляции дифференцировки клеток. В то же время другой регуляторной системой, которая обуславливает пролиферацию или дифференцировку клеток, является система цитокин-опосредованных сигнальных каскадов. В зависимости от воздействующих на клетку цитокинов происходит активация тех или иных циклинов и циклин-зависимых киназ, направляющие клетку в пролиферацию или дифференцировку. При этом могут активироваться сигнальные каскады,

приводящие клетку к тому, что она перестает быть восприимчива к воздействию ростовых факторов и уходит в терминальную дифференцировку.

Аберрантное ремоделирование внеклеточного матрикса связано с нарушениями дифференцировки клеток, повышением их инвазивного потенциала и развитием различных патологий, включая различные фиброзные заболевания, нарушения ангиогенеза, опухолеобразование и метастазирование. Аберрантная регуляция жизненного цикла клеток связана с такими заболеваниями, как атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, ишемия, вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания и рак (Cox T.R. et al., 2011) (Lu P. et al., 2011) (Zhang Q. et al., 2014) (Zhivotovsky B. et al., 2010).

Проведенный анализ указал на важную роль транскрипционного фактора FRA1 как регуляторного звена, которое оказывает воздействие сразу на несколько процессов, связанных с развитием псориатического повреждения. Идентифицированные в ходе анализа молекулярные мишени и сигнальные каскады могут быть использованы при разработке моделей заболевания. Они также могут выступать в качестве потенциальных мишеней для разработки терапии не только иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, но и заболеваний, связанных с избыточным ремоделированием внеклеточного матрикса и аберрантной пролиферацией клеток. В целом, исследования процессов, лежащих в основе регуляции гомеостаза внеклеточного матрикса, открывают большие возможности для идентификации терапевтических мишеней для лечения широкого класса заболеваний, а также для разработки эффективных методов пространственно-временного мониторинга его ремоделирования. Активная разработка терапевтических подходов на основе малых молекул, модулирующих активность циклин-зависимых киназ, в последние десятилетия уже привела к разработке новых методов терапии раковых заболеваний и, несомненно, будет динамично развиваться в ближайшие годы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Псориаз – многофакторное иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи, неизлечимое на сегодняшний день. Проявления псориаза варьируют по степени тяжести, им часто сопутствуют различные коморбидности. Заболевание широко распространено (в среднем около 2% популяции, в развитых странах до 8.5%) (Parisi R. et al., 2013). Патогенез заболевания связан с изменениями в иммунных профилях кожи больных, «цитокиновым штормом» в очагах, избыточной инфильтрацией кожи иммунными клетками, а также гиперпролиферацией и нарушенной дифференцировкой кератиноцитов, а также разрастанием сосудистой сети в областях поражения. Все это приводит к появлению на коже характерных повреждений – псориазных 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.

Принимая во внимание значительную распространенность заболевания, его до конца не выясненную этиологию, хроническое течение и отсутствие методов лечения, позволяющих не только купировать симптомы, но и излечить заболевание, можно констатировать, что изучение молекулярно-генетической природы псориаза и идентификация ключевых регуляторных звеньев патогенеза являются очень актуальными на сегодняшний день задачами.

В данной работе был применен современный масштабный подход, который позволил оценить полногеномные изменения экспрессии при псориазе. Использование базы данных MetaCore позволило идентифицировать основные измененные сигнальные каскады и их потенциальные регуляторы, с том числе транскрипционные факторы, которые ранее не были ассоциированы с псориазом. Эти результаты не только расширяют наше понимание патогенеза заболевания, но и могут быть использованы для разработки новых подходов к его терапии.

Проведенный анализ показал, что изменения, характерные для кератиноцитов при псориазе, связаны с изменениями экспрессии генов, регулируемых членами транскрипционного фактора AP-1. В данной работе была выдвинута гипотеза о роли одного из них, белка FRA1, в качестве регулятора транскрипции генов, связанных с пролиферацией кератиноцитов и продукцией хемоаттрактантов и эндопептидаз. Его роль в патогенезе предположительно связана с низким потенциалом трансактивации и снижением общей регуляторной активности FRA1-содержащих димеров AP-1. Выдвинутая гипотеза была подтверждена изменениями экспрессии генов-мишеней FRA1 в кератиноцитах, сверхэкспрессирующих *FRA1*, либо с ингибированной экспрессией этого гена.

Таким образом, можно сделать вывод, что транскрипционный фактор FRA1 имеет важное регуляторное значение в патогенезе псориаза, оказывая влияние на изменения пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, ремоделирование внеклеточного матрикса и миграцию клеток. Модулирование активности FRA1 через соответствующие сигнальные каскады может рассматриваться в качестве потенциальной области для разработки терапии псориаза. Кроме того, оценка уровней экспрессии этого гена, а также активности его мишеней может применяться в качестве маркерного признака при создании моделей псориазоподобного воспаления.

ВЫВОДЫ

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

2. Анализ обогащений сигнальных каскадов по функциям белковых продуктов позволил выявить ключевые факторы транскрипции, регулирующие измененные сигнальные каскады, и впервые ассоциировать 37 транскрипционных факторов с псориазом.

3. Одним из основных регуляторов дифференциально экспрессированных генов является транскрипционный фактор AP-1, в частности, его компонент FRA1, который, как впервые установлено, гиперэкспрессирован в коже больных псориазом на уровне мРНК и белка.

4. Координированные изменения экспрессии генов-мишеней FRA1 - *MMP1*, *MMP12*, *CCNA2* при его сверхэкспрессии или ингибировании говорят о важной роли FRA1 как регулятора сигнальных каскадов ремоделирования внеклеточного матрикса и пролиферации клеток при псориазе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ

ADAM17 - ADAM metalloproteinase domain 17

AMP – антимикробные пептиды

AP-1 - Activating Protein 1

ATF1 - Activating Transcription Factor 1

ATF7 - Activating Transcription Factor 7

bZIP - basic region leucine Zipper, структура «лейциновой застежки-молнии»

CCL17 - Chemokine (C-C motif) Ligand 17

CCL20 - Chemokine (C-C motif) Ligand 20

Ccna2 – циклин A2

Ccnd1 – циклин D1

CCR4 - Chemokine (C-C motif) Receptor 4

CCR6 - Chemokine (C-C motif) Receptor 6

CD11a - поверхностный клеточный гликопротеин CD11a

CD2 - поверхностный клеточный гликопротеин CD2

CD274 - поверхностный клеточный гликопротеин CD274

CD4 - поверхностный клеточный гликопротеин CD4, маркер Т-хелперов

Cd44 – поверхностный клеточный гликопротеин CD44

CD8 - поверхностный клеточный гликопротеин CD8, маркер цитотоксических Т-лимфоцитов

CD86 - поверхностный клеточный гликопротеин CD86

CDKAL1 – белок 1, ассоциированный с регуляторной субъединицей CDK5

CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A

CLA - P-selectin glycoprotein ligand 1

CMV – CytoMegaloVirus

CRE - cAMP Responsive Element

DDC - дермальные дендритные клетки

EGF - эпидермальный фактор роста

ELN – эластин

ERK – митоген-активируемая протеинкиназа 1
Fas - TNF receptor superfamily, member 6
FasL- Fas ligand
FOS - FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOSB - FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
FOSL1 - FOS-like antigen 1
FOSL2 - FOS-like antigen 1
FRA1 - FOS-like antigen 1
GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
H2k^b – Histocompatibility 2 K region
HaCaT – клеточная линия кератиноцитов человека
HLA-C - лейкоцитарный антиген человека
iDDC - провоспалительные дермальные дендритные клетки
IFN- α - интерферон-альфа, интерферон I типа
IFN- γ – интерферон-гамма, интерферон II типа
IL-13 – интерлейкин 13
IL-17 – интерлейкин 17
IL-17A – интерлейкин 17 A
IL-17F – интерлейкин 17 F
IL-17F – интерлейкин 17 F
IL-17R – рецептор интерлейкина 17
IL-17A – интерлейкин 17 A
IL-18 - интерлейкин 18
IL-1 α – интерлейкин 1- альфа
IL-1 β – интерлейкин 1- бета
IL-22 – интерлейкин 22
IL-22 – интерлейкин 22
IL22R – рецептор интерлейкина 22
IL-23 – интерлейкин 23

IL-23A - интерлейкин 23, альфа-субъединица
IL-23R – рецептор интерлейкина 23
IL-27 – интерлейкин 27
IL-4 – интерлейкин 4
IL6 – интерлейкин 6
IL-6- интерлейкин 6
IRF3 - Interferon Regulatory Factor 3
IVL - инволюкрин
JAK - Janus kinase
JNK - mitogen-activated protein kinase 8
JUN - jun proto-oncogene
JUNB - jun B proto-oncogene
JUND - jun D proto-oncogene
LL-37 – белок кателицидин
MAPKK - Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK - Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEN1 – менин 1
MHC – основной комплекс гистосовместимости
MMP1 – матриксная металлопротеаза 1
MMP9 – матриксная металлопротеаза 9
Mo – моноциты
moDC – дендритные клетки моноцитарного происхождения
NF-κB – Nuclear Factor κappa B
NK –естественные киллеры
NKT – естественные т-киллеры
NO - оксид азота
NO - оксид азота
NQO1 - NAD(P)H dehydrogenase Quinone 1
NSE – Neuron-Specific Enolase

p38 - mitogen-activated protein kinase 14

PAMP - молекулярные образы патогена

pDC - плазмоцитоидные дендритные клетки

PDE4 - cAMP-specific Phosphodiesterase 4A

PLAUR - Plasminogen Activator Urokinase Receptor

PRR - рецепторы распознавания образа

PSORS – локус предрасположенности к псориазу

Ras - RAS oncogene

RT – Room Temperature

src- v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)

S100 – белки семейства S100 (100% растворимые в сульфате аммония при нейтральном pH)

SRE - Serum Response Element

SV40 - Simian Virus 40

Tc17 – Т-киллеры 17

TCR – Т-клеточный рецептор

Th1 – Т-хелперы 1

Th17 – Т-хелперы 17

Th22 – Т-хелперы 22

Thr231 – 231 позиция аминокислоты тирозина

TLR - Толл-подобные рецепторы

TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа

TRE - TPA-Responsive Element

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

VIP - Vasoactive Intestinal Polypeptide

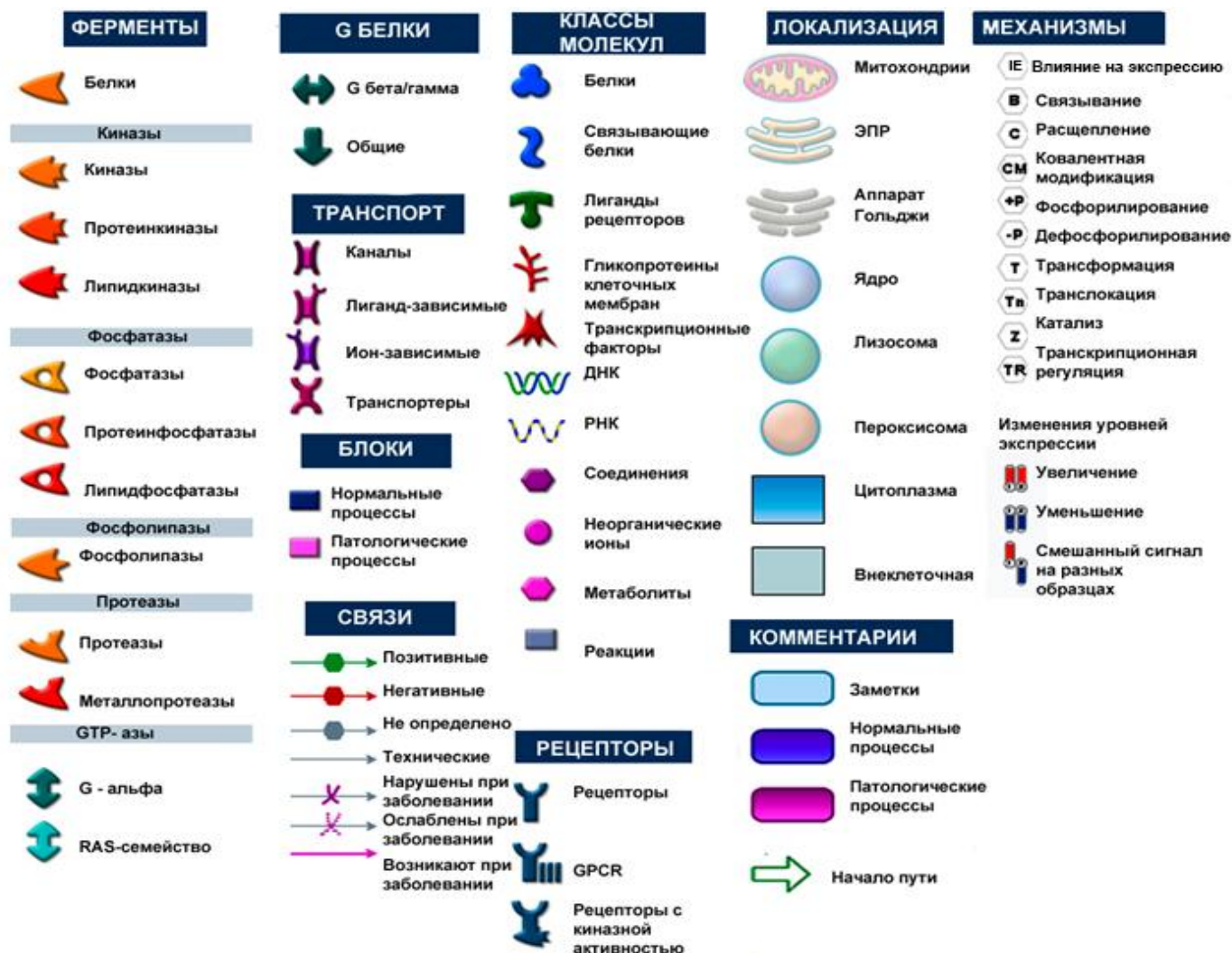
VLA-1 - integrin, alpha 1

ZNF – Zinc Finger protein

ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Условные обозначения, используемые на картах сетевых взаимодействий генов.



Приложение 2. Транскрипционные регуляторы дифференциально экспрессированных генов.

Название транскрипционного фактора	Кол-во связей ТФ с генами в списке ДЭГ (А)	Общее кол-во ДЭГ в анализе (n)	Общее кол-во связей ТФ в базе данных (R)	Кол-во объектов в базе данных (N)	Количество связей, ожидаемое случайно (E)	A/E	z-score (уровень обогащения списка ДЭГ связями данного ТФ)	p-value
STAT1	76	1195	337	26674	15.10	5.03	16.14	3.17E-32
NF-kB	65	1195	311	26674	13.93	4.67	14.08	1.00E-25
IRF8	57	1195	250	26674	11.20	5.09	14.07	1.05E-24
p50	79	1195	441	26674	19.76	4.00	13.75	2.47E-26
T-bet	22	1195	49	26674	2.20	10.02	13.69	2.75E-17
RelA	110	1195	778	26674	34.85	3.16	13.22	4.54E-27
p50/p65	44	1195	176	26674	7.88	5.58	13.20	4.67E-21
c-Rel	48	1195	211	26674	9.45	5.08	12.88	5.77E-21
IRF1	46	1195	198	26674	8.87	5.19	12.80	1.52E-20
PU.1	68	1195	380	26674	17.02	3.99	12.73	8.63E-23
AP-1	57	1195	290	26674	12.99	4.39	12.56	2.46E-21
PPAR γ	51	1195	266	26674	11.92	4.28	11.64	9.73E-19
STAT6	39	1195	175	26674	7.84	4.97	11.42	5.79E-17
STAT3	80	1195	557	26674	24.95	3.21	11.39	2.39E-20
C/EBP β	80	1195	592	26674	26.52	3.02	10.74	1.01E-18
ISGF3	10	1195	18	26674	0.81	12.40	10.48	9.89E-10
C/EBP α	56	1195	361	26674	16.17	3.46	10.20	4.3E-16
SP1	149	1195	1553	26674	69.57	2.14	10.04	5.75E-19
LXR α	24	1195	95	26674	4.26	5.64	9.81	3.15E-12
c-Jun	89	1195	768	26674	34.41	2.59	9.66	2.1E-16
STAT5A	25	1195	105	26674	4.70	5.31	9.59	4.67E-12
PPAR γ /RXR α	25	1195	105	26674	4.70	5.31	9.59	4.67E-12
STAT5B	19	1195	68	26674	3.05	6.24	9.36	8.52E-11
IRF7	14	1195	41	26674	1.84	7.62	9.19	1.38E-09
STAT2	19	1195	71	26674	3.18	5.97	9.09	1.94E-10
c-Fos	42	1195	271	26674	12.14	3.46	8.81	2.14E-12

p50/p50	18	1195	68	26674	3.05	5.91	8.78	7.06E-10
NR3C4	96	1195	930	26674	41.66	2.30	8.77	2.13E-14
RelB	34	1195	198	26674	8.87	3.83	8.67	1.5E-11
p105	15	1195	53	26674	2.37	6.32	8.39	6.78E-09
p65/p65	10	1195	26	26674	1.16	8.59	8.38	8.64E-08
GCRa	110	1195	1177	26674	52.73	2.09	8.25	1.99E-13
C/EBPe	10	1195	27	26674	1.21	8.27	8.18	1.32E-07
IRF9	9	1195	23	26674	1.03	8.73	8.04	3.26E-07
NKRF	3	1195	3	26674	0.13	22.32	8.00	8.97E-05
E2F1/DP1	5	1195	8	26674	0.36	13.95	7.93	8.95E-06
STAT5	20	1195	94	26674	4.21	4.75	7.89	5.19E-09
JunD	30	1195	183	26674	8.20	3.66	7.82	7.48E-10
ETS1	48	1195	378	26674	16.93	2.83	7.78	8.76E-11
p53	98	1195	1055	26674	47.26	2.07	7.70	6.37E-12
Oct-1	28	1195	169	26674	7.57	3.70	7.62	2.14E-09
GRHL2	12	1195	42	26674	1.88	6.38	7.55	1.96E-07
STAT4	10	1195	31	26674	1.39	7.20	7.48	5.88E-07
Bcl-6	23	1195	128	26674	5.73	4.01	7.39	1.18E-08
JunB	22	1195	120	26674	5.38	4.09	7.35	1.67E-08
ETS	14	1195	57	26674	2.55	5.48	7.34	1.54E-07
ELF4	6	1195	13	26674	0.58	10.30	7.27	1.04E-05
ESR1 (nuclear)	105	1195	1208	26674	54.12	1.94	7.24	5.67E-11
CAR/RXRa	8	1195	22	26674	0.99	8.12	7.23	2.89E-06
VDR	30	1195	202	26674	9.05	3.32	7.15	8.2E-09
EGR3	7	1195	18	26674	0.81	8.68	7.06	7.33E-06
NF-AT1(NFATC2)	17	1195	87	26674	3.90	4.36	6.80	2.68E-07
IRF2	15	1195	71	26674	3.18	4.72	6.79	4.65E-07
NF-kB2 (p52)	19	1195	105	26674	4.70	4.04	6.76	1.93E-07
C/EBPd	24	1195	154	26674	6.90	3.48	6.68	9.88E-08
Fra-2	14	1195	66	26674	2.96	4.73	6.58	1.06E-06
CREB5	2	1195	2	26674	0.09	22.32	6.53	0.002005
IRF3	12	1195	53	26674	2.37	5.05	6.40	3E-06
POLR2A	7	1195	21	26674	0.94	7.44	6.39	2.38E-05

HNF4a	48	1195	451	26674	20.20	2.38	6.38	3.01E-08
RXRA	23	1195	152	26674	6.81	3.38	6.37	3.13E-07
SREBP1 (nuclear)	22	1195	144	26674	6.45	3.41	6.28	4.74E-07
VDR/RXRa	15	1195	80	26674	3.58	4.19	6.18	2.31E-06
RBP-Jk(CBF1)	19	1195	117	26674	5.24	3.62	6.16	1.1E-06
HNF1a	31	1195	251	26674	11.24	2.76	6.06	3.46E-07
PXR/RXRa	7	1195	23	26674	1.03	6.79	6.02	4.64E-05
c-Jun/c-Fos	14	1195	74	26674	3.32	4.22	6.01	4.47E-06
Tip60	3	1195	5	26674	0.22	13.39	6.00	0.000838
LITAF	3	1195	5	26674	0.22	13.39	6.00	0.000838
E2F3/DP1	3	1195	5	26674	0.22	13.39	6.00	0.000838
KLF6	10	1195	43	26674	1.93	5.19	5.96	1.56E-05
KLF13	4	1195	9	26674	0.40	9.92	5.80	0.000421
ATF-3	16	1195	97	26674	4.35	3.68	5.73	6.17E-06
GFI-1	9	1195	38	26674	1.70	5.29	5.73	3.55E-05
TBP	17	1195	108	26674	4.84	3.51	5.67	6.15E-06
HMG1/Y	11	1195	54	26674	2.42	4.55	5.65	2.26E-05
HIF1A	55	1195	601	26674	26.92	2.04	5.60	4.85E-07
RXR	7	1195	26	26674	1.16	6.01	5.53	0.000111
CREM (repressors)	9	1195	40	26674	1.79	5.02	5.51	5.49E-05
EGR2 (Krox20)	13	1195	73	26674	3.27	3.98	5.51	1.94E-05
NCOA2 (GRIP1/TIF2)	4	1195	10	26674	0.45	8.93	5.43	0.000677
ASH2	5	1195	15	26674	0.67	7.44	5.40	0.000369
ZNF263	3	1195	6	26674	0.27	11.16	5.39	0.00162
EGFR	3	1195	6	26674	0.27	11.16	5.39	0.00162
PURB	3	1195	6	26674	0.27	11.16	5.39	0.00162
GATA-3	56	1195	632	26674	28.31	1.98	5.39	1.06E-06
PAX5	19	1195	137	26674	6.14	3.10	5.33	1.19E-05
ETS2	17	1195	117	26674	5.24	3.24	5.27	1.83E-05
p73	20	1195	150	26674	6.72	2.98	5.26	1.29E-05
LXRb/RXRa	7	1195	28	26674	1.25	5.58	5.25	0.000184
LXRa/RXRa	9	1195	43	26674	1.93	4.67	5.22	0.0001
FXR	18	1195	129	26674	5.78	3.11	5.21	1.85E-05

NF45 (ILF2)	2	1195	3	26674	0.13	14.88	5.21	0.005837
SOX13	2	1195	3	26674	0.13	14.88	5.21	0.005837
NFYB	17	1195	119	26674	5.33	3.19	5.18	2.29E-05
ERM	5	1195	16	26674	0.72	6.98	5.18	0.000517
SP3	45	1195	486	26674	21.77	2.07	5.14	3.85E-06
E2F4	33	1195	317	26674	14.20	2.32	5.13	6.75E-06
PPARα	22	1195	177	26674	7.93	2.77	5.13	1.52E-05
Nkx6.1	4	1195	11	26674	0.49	8.12	5.11	0.001027
Zac1	4	1195	11	26674	0.49	8.12	5.11	0.001027
RUNX3	10	1195	53	26674	2.37	4.21	5.07	0.000105
FOXO3A	22	1195	179	26674	8.02	2.74	5.07	1.81E-05
Fra-1	12	1195	71	26674	3.18	3.77	5.07	6.85E-05
p63	40	1195	419	26674	18.77	2.13	5.05	6.35E-06
EBF	17	1195	123	26674	5.51	3.09	5.02	3.54E-05
AML1 (RUNX1)	26	1195	232	26674	10.39	2.50	4.97	1.74E-05
KLF5	10	1195	55	26674	2.46	4.06	4.92	0.000146
JunD/c-Fos	3	1195	7	26674	0.31	9.57	4.91	0.002741
NFYA	17	1195	126	26674	5.64	3.01	4.90	4.84E-05
PLZF/RARα	12	1195	74	26674	3.32	3.62	4.89	0.000104
c-Myb	20	1195	161	26674	7.21	2.77	4.89	3.67E-05
HIF-1	11	1195	65	26674	2.91	3.78	4.86	0.000135
ATF-2	20	1195	162	26674	7.26	2.76	4.85	4.01E-05
C/EBP	10	1195	56	26674	2.51	3.99	4.84	0.00017
IRF5	8	1195	39	26674	1.75	4.58	4.84	0.000282
p65/c-Rel	4	1195	12	26674	0.54	7.44	4.83	0.001486
EGR1	40	1195	434	26674	19.44	2.06	4.81	1.46E-05
SRF	37	1195	401	26674	17.96	2.06	4.63	2.93E-05
AP-2B	6	1195	26	26674	1.16	5.15	4.59	0.000849
DEC1 (Stra13)	11	1195	70	26674	3.14	3.51	4.55	0.000266
IRF4	39	1195	438	26674	19.62	1.99	4.51	4E-05
PURα	5	1195	20	26674	0.90	5.58	4.44	0.001579
ZHX2	2	1195	4	26674	0.18	11.16	4.40	0.011327
RBCK1	2	1195	4	26674	0.18	11.16	4.40	0.011327

E2F4/DP1	2	1195	4	26674	0.18	11.16	4.40	0.011327
HOXB8	2	1195	4	26674	0.18	11.16	4.40	0.011327
RFX5	4	1195	14	26674	0.63	6.38	4.36	0.002796
MafK	4	1195	14	26674	0.63	6.38	4.36	0.002796
BACH2	6	1195	28	26674	1.25	4.78	4.34	0.001287
NUR77	8	1195	45	26674	2.02	3.97	4.32	0.000779
NF-Y	22	1195	208	26674	9.32	2.36	4.27	0.000175
HNF3α	20	1195	182	26674	8.15	2.45	4.26	0.000203
PPARα/RXRα	13	1195	97	26674	4.35	2.99	4.26	0.000388
FosB	9	1195	56	26674	2.51	3.59	4.20	0.0008
KLF8	3	1195	9	26674	0.40	7.44	4.18	0.006148
TCF7L2 (TCF4)	31	1195	339	26674	15.19	2.04	4.18	0.000148
ATF-4	12	1195	88	26674	3.94	3.04	4.16	0.000547
DLX4 (BP1)	4	1195	15	26674	0.67	5.95	4.15	0.003679
FOXP3	23	1195	227	26674	10.17	2.26	4.13	0.000238
ELF3	6	1195	30	26674	1.34	4.46	4.11	0.001879
FKHR	22	1195	215	26674	9.63	2.28	4.09	0.00028
NRF2	18	1195	162	26674	7.26	2.48	4.09	0.000362
BACH1	7	1195	39	26674	1.75	4.01	4.07	0.001555
E2F5	5	1195	23	26674	1.03	4.85	4.00	0.003066
E2F8	5	1195	23	26674	1.03	4.85	4.00	0.003066
BATF	4	1195	16	26674	0.72	5.58	3.97	0.004733
E2F2	14	1195	116	26674	5.20	2.69	3.96	0.000695
C/EBPz	12	1195	93	26674	4.17	2.88	3.93	0.000905
IRF6	3	1195	10	26674	0.45	6.70	3.90	0.008493
CREB3	3	1195	10	26674	0.45	6.70	3.90	0.008493
LXRb	7	1195	41	26674	1.84	3.81	3.90	0.002103
RARα	15	1195	130	26674	5.82	2.58	3.90	733
BLIMP1	11	1195	83	26674	3.72	2.96	3.87	1.17E-03
LDB1	2	1195	5	26674	0.22	8.93	3.84	0.02
TLE3	2	1195	5	26674	0.22	8.93	3.84	0.02
ADNP	2	1195	5	26674	0.22	8.93	3.84	0.02
SMAD2	15	1195	134	26674	6.00	2.50	3.77	1.01E-03

ELF5	5	1195	25	26674	1.12	4.46	3.75	4.50E-03
CBFβ	7	1195	43	26674	1.93	3.63	3.74	2.79 E-04
KLF2	6	1195	34	26674	1.52	3.94	3.71	3.66E-03
Lef-1	15	1195	136	26674	6.09	2.46	3.70	1.17E-03
FOXP2	20	1195	204	26674	9.14	2.19	3.69	8.92E-04
ELF1	11	1195	87	26674	3.90	2.82	3.69	1.73E-03
FOXM1	12	1195	99	26674	4.44	2.71	3.68	1.57E-03
NF-E2	8	1195	54	26674	2.42	3.31	3.67	2.64E-03
E2F3	16	1195	150	26674	6.72	2.38	3.67	1.1E-03
USF1	21	1195	219	26674	9.81	2.14	3.67	8.95E-04
PXR	7	1195	44	26674	1.97	3.55	3.67	3.19E-03
ERR2	10	1195	76	26674	3.40	2.94	3.66	2.04E-03
AP-2A	24	1195	263	26674	11.78	2.04	3.66	8.12E-04
HFH3	3	1195	11	26674	0.49	6.09	3.65	0.01
ESR2	15	1195	138	26674	6.18	2.43	3.64	1.36E-03
RORγ	5	1195	26	26674	1.16	4.29	3.64	5.36E-03
Ikaros	9	1195	66	26674	2.96	3.04	3.60	2.62E-03
GLI-2	7	1195	45	26674	2.02	3.47	3.59	3.64E-03
ERR1	19	1195	194	26674	8.69	2.19	3.59	1.20E-03
RORα	10	1195	78	26674	3.49	2.86	3.57	2.48E-03
AHR	22	1195	239	26674	10.71	2.05	3.55	1.17E-03
Oct-2	6	1195	36	26674	1.61	3.72	3.54	4.91E-03
HNF3γ	4	1195	19	26674	0.85	4.70	3.49	9.06E-03
E4BP4	8	1195	57	26674	2.55	3.13	3.49	3.72E-03
E2A	12	1195	104	26674	4.66	2.58	3.49	2.39E-03
RUNX2	16	1195	157	26674	7.03	2.27	3.47	1.88E-03
c-Jun/Fra-1	3	1195	12	26674	0.54	5.58	3.44	0.01
MBD1	3	1195	12	26674	0.54	5.58	3.44	0.01
β-catenin	3	1195	12	26674	0.54	5.58	3.44	0.01
ZNF202	4	1195	20	26674	0.90	4.46	3.36	0.01
TCF7 (TCF1)	5	1195	29	26674	1.30	3.85	3.32	8.67E-03
MafB	5	1195	29	26674	1.30	3.85	3.32	8.67E-03
AP-4	8	1195	60	26674	2.69	2.98	3.32	5.13E-03

TRβ1	12	1195	109	26674	4.88	2.46	3.30	3.54E-03
E2F1	53	1195	771	26674	34.54	1.53	3.26	1.42E-03
NeuroD/E47	3	1195	13	26674	0.58	5.15	3.24	0.02
NFIB	5	1195	30	26674	1.34	3.72	3.23	0.01
p50/c-Rel	4	1195	21	26674	0.94	4.25	3.23	0.01
PEA3	9	1195	74	26674	3.32	2.71	3.20	0.01
KLF4	23	1195	272	26674	12.19	1.89	3.19	2.78E-03
CREM (activators)	10	1195	87	26674	3.90	2.57	3.17	5.50E-03
TAL1	17	1195	183	26674	8.20	2.07	3.16	3.67 E-03
CLOCK	9	1195	75	26674	3.36	2.68	3.15	0.01
KLF15	5	1195	31	26674	1.39	3.60	3.14	0.01
TITF1	10	1195	88	26674	3.94	2.54	3.13	0.01
MEF2C	8	1195	64	26674	2.87	2.79	3.11	0.01
NRF1	13	1195	130	26674	5.82	2.23	3.05	0.01
BMAL1	11	1195	104	26674	4.66	2.36	3.01	0.01
LRH1	11	1195	104	26674	4.66	2.36	3.01	0.01
TRα	10	1195	91	26674	4.08	2.45	3.01	0.01
PML/RARα	6	1195	43	26674	1.93	3.11	3.01	0.01
USF1/USF2	6	1195	43	26674	1.93	3.11	3.01	0.01
CAR	4	1195	23	26674	1.03	3.88	2.99	0.02
KLF11 (TIEG2)	4	1195	23	26674	1.03	3.88	2.99	0.02
SREBP1	5	1195	33	26674	1.48	3.38	2.97	0.02
ZNF145	5	1195	33	26674	1.48	3.38	2.97	0.02
SOX9	11	1195	106	26674	4.75	2.32	2.94	7.96E-03
GATA-1	28	1195	367	26674	16.44	1.70	2.94	4.53E-03
b-Myb	10	1195	93	26674	4.17	2.40	2.93	8.744E-03
PAX8	10	1195	93	26674	4.17	2.40	2.93	0.008744
USF2	13	1195	134	26674	6.00	2.17	2.93	0.007242
SREBP2 (nuclear)	8	1195	68	26674	3.05	2.63	2.91	0.010835
ZNF42 (MZF1)	6	1195	45	26674	2.02	2.98	2.87	0.014608
HNF3β	21	1195	260	26674	11.65	1.80	2.82	0.006923
AML1/ETO	9	1195	83	26674	3.72	2.42	2.81	0.011895
FoxL2	7	1195	58	26674	2.60	2.69	2.80	0.014609

AP-2C	12	1195	125	26674	5.60	2.14	2.77	0.010445
DBP	29	1195	396	26674	17.74	1.63	2.76	0.006857
NFIC	6	1195	47	26674	2.11	2.85	2.75	0.017865
POU3F2 (BRN2)	10	1195	98	26674	4.39	2.28	2.74	0.012427
SNAIL1	8	1195	72	26674	3.23	2.48	2.72	0.01502
PR (nuclear)	19	1195	238	26674	10.66	1.78	2.62	0.011085
HSF1	21	1195	273	26674	12.23	1.72	2.58	0.011684
LHX2	27	1195	382	26674	17.11	1.58	2.46	0.013644
ZNF143	18	1195	1013	26674	45.38	0.40	-4.24	1.58E-06

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adhikary G., Crish J., Lass J., Eckert R. L. Regulation of involucrin expression in normal human corneal epithelial cells: a role for activator protein one // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2004. – Т. 45, № 4. – С. 1080-7.
2. Adisheshaiah P., Lindner D. J., Kalvakolanu D. V., Reddy S. P. FRA-1 proto-oncogene induces lung epithelial cell invasion and anchorage-independent growth in vitro, but is insufficient to promote tumor growth in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – Т. 67, № 13. – С. 6204-11.
3. Adisheshaiah P., Papaiahgari S. R., Vuong H., Kalvakolanu D. V., Reddy S. P. Multiple cis-elements mediate the transcriptional activation of human fra-1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in bronchial epithelial cells // *J Biol Chem.* – 2003. – Т. 278, № 48. – С. 47423-33.
4. Albanesi C., Cavani A., Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha // *J Immunol.* – 1999. – Т. 162, № 1. – С. 494-502.
5. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data // *Genome Biol.* – 2010. – Т. 11, № 10. – С. R106.
6. Arsic N., Bendris N., Peter M., Begon-Pescia C., Rebouissou C., Gadea G., Bouquier N., Bibeau F., Lemmers B., Blanchard J. M. A novel function for Cyclin A2: control of cell invasion via RhoA signaling // *J Cell Biol.* – 2012. – Т. 196, № 1. – С. 147-62.
7. Belguise K., Kersual N., Galtier F., Chalbos D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells // *Oncogene.* – 2005. – Т. 24, № 8. – С. 1434-44.
8. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* – 1995. – Т. 57, № 1. – С. 11.
9. Bergman M. R., Cheng S., Honbo N., Piacentini L., Karliner J. S., Lovett D. H. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers // *Biochem J.* – 2003. – Т. 369, № Pt 3. – С. 485-96.
10. Bernard F. X., Morel F., Camus M., Pedretti N., Barrault C., Garnier J., Lecron J. C. Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis // *J Allergy (Cairo).* – 2012. – Т. 2012. – С. 718725.
11. Bessarabova M., Ishkin A., JeBailey L., Nikolskaya T., Nikolsky Y. Knowledge-based analysis of proteomics data // *BMC Bioinformatics.* – 2012. – Т. 13 Suppl 16. – С. S13.
12. Bidder M., Loewy A. P., Latifi T., Newberry E. P., Ferguson G., Willis D. M., Towler D. A. Ets domain transcription factor PE1 suppresses human interstitial collagenase promoter activity by antagonizing protein-DNA interactions at a critical AP1 element // *Biochemistry.* – 2000. – Т. 39, № 30. – С. 8917-28.
13. Bigler J., Rand H. A., Kerkof K., Timour M., Russell C. B. Cross-study homogeneity of psoriasis gene expression in skin across a large expression range // *PLoS One.* – 2013. – Т. 8, № 1. – С. e52242.
14. Bowcock A. M., Cookson W. O. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis // *Hum Mol Genet.* – 2004. – Т. 13 Spec No 1. – С. R43-55.
15. Bowcock A. M., Shannon W., Du F., Duncan J., Cao K., Aftergut K., Catier J., Fernandez-Vina M. A., Menter A. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies // *Hum Mol Genet.* – 2001. – Т. 10, № 17. – С. 1793-805.
16. Buchakjian M. R., Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Т. 11, № 10. – С. 715-27.
17. Burch P. M., Yuan Z., Loonen A., Heintz N. H. An extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-dependent program of chromatin trafficking of c-Fos and Fra-1 is required for cyclin D1 expression during cell cycle reentry // *Mol Cell Biol.* – 2004. – Т. 24, № 11. – С. 4696-709.
18. Casalino L., Bakiri L., Talotta F., Weitzman J. B., Fusco A., Yaniv M., Verde P. Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin A transcription // *EMBO J.* – 2007. – Т. 26, № 7. – С. 1878-90.

19. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control // *Gene*. – 2002. – T. 299, № 1-2. – C. 35-55.
20. Cox T. R., Erler J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer // *Dis Model Mech*. – 2011. – T. 4, № 2. – C. 165-78.
21. Curwen V., Eyraas E., Andrews T. D., Clarke L., Mongin E., Searle S. M., Clamp M. The Ensembl automatic gene annotation system // *Genome Res*. – 2004. – T. 14, № 5. – C. 942-50.
22. Das K. C., Muniyappa H. c-Jun-NH2 terminal kinase (JNK)-mediates AP-1 activation by thioredoxin: phosphorylation of cJun, JunB, and Fra-1 // *Mol Cell Biochem*. – 2010. – T. 337, № 1-2. – C. 53-63.
23. de Cid R., Riveira-Munoz E., Zeeuwen P. L., Robarge J., Liao W., Dannhauser E. N., Giardina E., Stuart P. E., Nair R., Helms C., Escaramis G., Ballana E., Martin-Ezquerria G., den Heijer M., Kamsteeg M., Joosten I., Eichler E. E., Lazaro C., Pujol R. M., Armengol L., Abecasis G., Elder J. T., Novelli G., Armour J. A., Kwok P. Y., Bowcock A., Schalkwijk J., Estivill X. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis // *Nat Genet*. – 2009. – T. 41, № 2. – C. 211-5.
24. Delgado-Olguin P., Dang L. T., He D., Thomas S., Chi L., Sukonnik T., Khyzha N., Dobenecker M. W., Fish J. E., Bruneau B. G. Ezh2-mediated repression of a transcriptional pathway upstream of Mmp9 maintains integrity of the developing vasculature // *Development*. – 2014. – T. 141, № 23. – C. 4610-7.
25. Demirag G. G., Sullu Y., Gurgenyatagi D., Okumus N. O., Yucel I. Expression of plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in gastric cancers // *Diagn Pathol*. – 2011. – T. 6. – C. 1.
26. Di Meglio P., Perera G. K., Nestle F. O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function // *Immunity*. – 2011. – T. 35, № 6. – C. 857-69.
27. Durchdewald M., Angel P., Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease // *Histol Histopathol*. – 2009. – T. 24, № 11. – C. 1451-61.
28. Eckert R. L., Adhikary G., Young C. A., Jans R., Crish J. F., Xu W., Rorke E. A. AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer // *J Skin Cancer*. – 2013. – T. 2013. – C. 537028.
29. Eder L., Chandran V., Gladman D. D. What have we learned about genetic susceptibility in psoriasis and psoriatic arthritis? // *Curr Opin Rheumatol*. – 2015. – T. 27, № 1. – C. 91-8.
30. Eferl R., Hoebertz A., Schilling A. F., Rath M., Karreth F., Kenner L., Amling M., Wagner E. F. The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation // *EMBO J*. – 2004. – T. 23, № 14. – C. 2789-99.
31. Ekins S., Bugrim A., Brovold L., Kirillov E., Nikolsky Y., Rakhmatulin E., Sorokina S., Ryabov A., Serebryiskaya T., Melnikov A., Metz J., Nikolskaya T. Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms // *Xenobiotica*. – 2006. – T. 36, № 10-11. – C. 877-901.
32. Ellinghaus D., Ellinghaus E., Nair R. P., Stuart P. E., Esko T., Metspalu A., Debrus S., Raelson J. V., Tejasvi T., Belouchi M., West S. L., Barker J. N., Koks S., Kingo K., Balschun T., Palmieri O., Annese V., Gieger C., Wichmann H. E., Kabesch M., Trembath R. C., Mathew C. G., Abecasis G. R., Weidinger S., Nikolaus S., Schreiber S., Elder J. T., Weichenthal M., Nothnagel M., Franke A. Combined analysis of genome-wide association studies for Crohn disease and psoriasis identifies seven shared susceptibility loci // *Am J Hum Genet*. – 2012. – T. 90, № 4. – C. 636-47.
33. Ellinghaus E., Ellinghaus D., Stuart P. E., Nair R. P., Debrus S., Raelson J. V., Belouchi M., Fournier H., Reinhard C., Ding J., Li Y., Tejasvi T., Gudjonsson J., Stoll S. W., Voorhees J. J., Lambert S., Weidinger S., Eberlein B., Kunz M., Rahman P., Gladman D. D., Gieger C., Wichmann H. E., Karlsen T. H., Mayr G., Albrecht M., Kabelitz D., Mrowietz U., Abecasis G. R., Elder J. T., Schreiber S., Weichenthal M., Franke A. Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2 // *Nat Genet*. – 2010. – T. 42, № 11. – C. 991-5.
34. Farkas A., Kemeny L. Monocyte-derived interferon-alpha primed dendritic cells in the pathogenesis of psoriasis: new pieces in the puzzle // *Int Immunopharmacol*. – 2012. – T. 13, № 2. – C. 215-8.

35. Feldmeyer L., Werner S., French L. E., Beer H. D. Interleukin-1, inflammasomes and the skin // *Eur J Cell Biol.* – 2010. – T. 89, № 9. – C. 638-44.
36. Finzer P., Soto U., Delius H., Patzelt A., Coy J. F., Poustka A., zur Hausen H., Rosl F. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition // *Oncogene.* – 2000. – T. 19, № 29. – C. 3235-44.
37. Funk M., Poensgen B., Graulich W., Jerome V., Muller R. A novel, transformation-relevant activation domain in Fos proteins // *Mol Cell Biol.* – 1997. – T. 17, № 2. – C. 537-44.
38. Galvan-Banqueri M., Marin Gil R., Santos Ramos B., Bautista Paloma F. J. Biological treatments for moderate-to-severe psoriasis: indirect comparison // *J Clin Pharm Ther.* – 2013. – T. 38, № 2. – C. 121-30.
39. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F. J., Zal T., Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8 // *J Exp Med.* – 2009. – T. 206, № 9. – C. 1983-94.
40. Garshick M. K., Kimball A. B. Psoriasis and the Life Cycle of Persistent Life Effects // *Dermatol Clin.* – 2015. – T. 33, № 1. – C. 25-39.
41. Gerdes S., Osadtschy S., Buhles N., Baurecht H., Mrowietz U. Cardiovascular biomarkers in patients with psoriasis // *Exp Dermatol.* – 2014. – T. 23, № 5. – C. 322-5.
42. Godsel L. M., Dubash A. D., Bass-Zubek A. E., Amargo E. V., Klessner J. L., Hobbs R. P., Chen X., Green K. J. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA // *Mol Biol Cell.* – 2010. – T. 21, № 16. – C. 2844-59.
43. Gomard T., Jariel-Encontre I., Basbous J., Bossis G., Mocquet-Torcy G., Piechaczyk M. Fos family protein degradation by the proteasome // *Biochem Soc Trans.* – 2008. – T. 36, № Pt 5. – C. 858-63.
44. Grinev V. V. [Design and quality control of short interfering RNAs] // *Mol Biol (Mosk).* – 2012. – T. 46, № 6. – C. 827-45.
45. Grochot-Przeczek A., Dulak J., Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in neovascularisation: A diabetic perspective // *Thromb Haemost.* – 2010. – T. 104, № 3. – C. 424-31.
46. Gudjonsson J. E., Ding J., Li X., Nair R. P., Tejasvi T., Qin Z. S., Ghosh D., Aphale A., Gumucio D. L., Voorhees J. J., Abecasis G. R., Elder J. T. Global gene expression analysis reveals evidence for decreased lipid biosynthesis and increased innate immunity in uninvolved psoriatic skin // *J Invest Dermatol.* – 2009. – T. 129, № 12. – C. 2795-804.
47. Gudjonsson J. E., Karason A., Runarsdottir E. H., Antonsdottir A. A., Hauksson V. B., Jonsson H. H., Gulcher J., Stefansson K., Valdimarsson H. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients // *J Invest Dermatol.* – 2006. – T. 126, № 4. – C. 740-5.
48. Guinea-Viniegra J., Zenz R., Scheuch H., Hnisz D., Holcman M., Bakiri L., Schonhaler H. B., Sibilina M., Wagner E. F. TNFalpha shedding and epidermal inflammation are controlled by Jun proteins // *Genes Dev.* – 2009. – T. 23, № 22. – C. 2663-74.
49. Hanel K. H., Cornelissen C., Luscher B., Baron J. M. Cytokines and the skin barrier // *Int J Mol Sci.* – 2013. – T. 14, № 4. – C. 6720-45.
50. Hanley K., Wood L., Ng D. C., He S. S., Lau P., Moser A., Elias P. M., Bikle D. D., Williams M. L., Feingold K. R. Cholesterol sulfate stimulates involucrin transcription in keratinocytes by increasing Fra-1, Fra-2, and Jun D // *J Lipid Res.* – 2001. – T. 42, № 3. – C. 390-8.
51. Hanselmann C., Mauch C., Werner S. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? // *Biochem J.* – 2001. – T. 353, № Pt 3. – C. 459-66.
52. Harshman K. D., Moye-Rowley W. S., Parker C. S. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4 // *Cell.* – 1988. – T. 53, № 2. – C. 321-30.
53. Heidenreich R., Rocken M., Ghoreschi K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis // *Int J Exp Pathol.* – 2009. – T. 90, № 3. – C. 232-48.

54. Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings // *J Cell Sci.* – 2004. – T. 117, № Pt 25. – C. 5965-73.
55. Hua H., Li M., Luo T., Yin Y., Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm // *Cell Mol Life Sci.* – 2011. – T. 68, № 23. – C. 3853-68.
56. Huang da W., Sherman B. T., Lempicki R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // *Nat Protoc.* – 2009. – T. 4, № 1. – C. 44-57.
57. Jabbari A., Suarez-Farinas M., Dewell S., Krueger J. G. Transcriptional profiling of psoriasis using RNA-seq reveals previously unidentified differentially expressed genes // *J Invest Dermatol.* – 2012. – T. 132, № 1. – C. 246-9.
58. Jamaluddin M. S. Aspirin upregulates expression of urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) gene in human colon cancer cells through AP1 // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – T. 348, № 2. – C. 618-27.
59. Jochum W., Passegue E., Wagner E. F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis // *Oncogene.* – 2001. – T. 20, № 19. – C. 2401-12.
60. Johnson-Huang L. M., Pensabene C. A., Shah K. R., Pierson K. C., Kikuchi T., Lentini T., Gilleaudeau P., Sullivan-Whalen M., Cueto I., Khatcherian A., Hyder L. A., Suarez-Farinas M., Krueger J. G., Lowes M. A. Post-therapeutic relapse of psoriasis after CD11a blockade is associated with T cells and inflammatory myeloid DCs // *PLoS One.* – 2012a. – T. 7, № 2. – C. e30308.
61. Johnson-Huang L. M., Suarez-Farinas M., Pierson K. C., Fuentes-Duculan J., Cueto I., Lentini T., Sullivan-Whalen M., Gilleaudeau P., Krueger J. G., Haider A. S., Lowes M. A. A single intradermal injection of IFN-gamma induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin // *J Invest Dermatol.* – 2012b. – T. 132, № 4. – C. 1177-87.
62. Joyce C. E., Zhou X., Xia J., Ryan C., Thrash B., Menter A., Zhang W., Bowcock A. M. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome // *Hum Mol Genet.* – 2011. – T. 20, № 20. – C. 4025-40.
63. Julien M., Khoshniat S., Lacreusette A., Gatus M., Bozec A., Wagner E. F., Wittrant Y., Masson M., Weiss P., Beck L., Magne D., Guicheux J. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1 // *J Bone Miner Res.* – 2009. – T. 24, № 11. – C. 1856-68.
64. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – T. 28, № 1. – C. 27-30.
65. Karin M., Liu Z., Zandi E. AP-1 function and regulation // *Curr Opin Cell Biol.* – 1997. – T. 9, № 2. – C. 240-6.
66. Kawai T., Akira S. TLR signaling // *Semin Immunol.* – 2007. – T. 19, № 1. – C. 24-32.
67. Kent L. N., Rumi M. A., Kubota K., Lee D. S., Soares M. J. FOSL1 is integral to establishing the maternal-fetal interface // *Mol Cell Biol.* – 2011. – T. 31, № 23. – C. 4801-13.
68. Kirkham B. W., Kavanaugh A., Reich K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis // *Immunology.* – 2014. – T. 141, № 2. – C. 133-42.
69. Klein E. A., Assoian R. K. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance // *J Cell Sci.* – 2008. – T. 121, № Pt 23. – C. 3853-7.
70. Koczan D., Guthke R., Thiesen H. J., Ibrahim S. M., Kundt G., Krentz H., Gross G., Kunz M. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear leukocytes from psoriasis patients identifies new immune regulatory molecules // *Eur J Dermatol.* – 2005. – T. 15, № 4. – C. 251-7.
71. Krueger J. G., Fretzin S., Suarez-Farinas M., Haslett P. A., Phipps K. M., Cameron G. S., McCollm J., Katcherian A., Cueto I., White T., Banerjee S., Hoffman R. W. IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. – T. 130, № 1. – C. 145-54 e9.
72. Kulski J. K., Kenworthy W., Bellgard M., Taplin R., Okamoto K., Oka A., Mabuchi T., Ozawa A., Tamiya G., Inoko H. Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals // *J Mol Med (Berl).* – 2005. – T. 83, № 12. – C. 964-75.

73. Kusumoto S., Kajihara I., Nagamoto E., Makino K., Ichihara A., Aoi J., Johno T., Makino T., Fukushima S., Jinnin M., Ihn H. Increased CCL22 expression in psoriatic skin predicts a good response to infliximab therapy // *Br J Dermatol.* – 2014. – T. 171, № 5. – C. 1259-61.
74. Larsen M., Artym V. V., Green J. A., Yamada K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling // *Curr Opin Cell Biol.* – 2006. – T. 18, № 5. – C. 463-71.
75. Leupold J. H., Asangani I., Maurer G. D., Lengyel E., Post S., Allgayer H. Src induces urokinase receptor gene expression and invasion/intravasation via activator protein-1/p-c-Jun in colorectal cancer // *Mol Cancer Res.* – 2007. – T. 5, № 5. – C. 485-96.
76. Li B., Tsoi L. C., Swindell W. R., Gudjonsson J. E., Tejasvi T., Johnston A., Ding J., Stuart P. E., Xing X., Kochkodan J. J., Voorhees J. J., Kang H. M., Nair R. P., Abecasis G. R., Elder J. T. Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms // *J Invest Dermatol.* – 2014. – T. 134, № 7. – C. 1828-38.
77. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* – 2001. – T. 25, № 4. – C. 402-8.
78. Lonnberg A. S., Zachariae C., Skov L. Targeting of interleukin-17 in the treatment of psoriasis // *Clin Cosmet Investig Dermatol.* – 2014. – T. 7. – C. 251-9.
79. Lovendorf M. B., Mitsui H., Zibert J. R., Ropke M. A., Hafner M., Dyring-Andersen B., Bonefeld C. M., Krueger J. G., Skov L. Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis // *Exp Dermatol.* – 2014.10.1111/exd.12604.
80. Lowes M. A., Bowcock A. M., Krueger J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis // *Nature.* – 2007. – T. 445, № 7130. – C. 866-73.
81. Lu P., Takai K., Weaver V. M., Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. – T. 3, № 12.
82. Mak R. K., Hundhausen C., Nestle F. O. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis // *Actas Dermosifiliogr.* – 2009. – T. 100 Suppl 2. – C. 2-13.
83. Maki Y., Bos T. J., Davis C., Starbuck M., Vogt P. K. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1987. – T. 84, № 9. – C. 2848-52.
84. Manczinger M., Kemeny L. Novel factors in the pathogenesis of psoriasis and potential drug candidates are found with systems biology approach // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 11. – C. e80751.
85. Mehic D., Bakiri L., Ghannadan M., Wagner E. F., Tschachler E. Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes // *J Invest Dermatol.* – 2005. – T. 124, № 1. – C. 212-20.
86. Menter M. A., Griffiths C. E. Psoriasis: The Future // *Dermatol Clin.* – 2015. – T. 33, № 1. – C. 161-166.
87. Mezentshev A., Nikolaev A., Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis // *Gene.* – 2014. – T. 540, № 1. – C. 1-10.
88. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis // *Eur J Cancer.* – 2005. – T. 41, № 16. – C. 2449-61.
89. Milde-Langosch K., Roder H., Andritzky B., Aslan B., Hemminger G., Brinkmann A., Bamberger C. M., Loning T., Bamberger A. M. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas // *Breast Cancer Res Treat.* – 2004. – T. 86, № 2. – C. 139-52.
90. Miracco C., Pellegrino M., Flori M. L., Vatti R., Materno M., Andreassi L. Cyclin D1, B and A expression and cell turnover in psoriatic skin lesions before and after cyclosporin treatment // *Br J Dermatol.* – 2000. – T. 143, № 5. – C. 950-6.
91. Mitsui H., Suarez-Farinas M., Belkin D. A., Levenkova N., Fuentes-Duculan J., Coats I., Fujita H., Krueger J. G. Combined use of laser capture microdissection and cDNA microarray analysis identifies locally expressed disease-related genes in focal regions of psoriasis vulgaris skin lesions // *J Invest Dermatol.* – 2012. – T. 132, № 6. – C. 1615-26.

92. Miyazaki H., Morishita J., Ueki M., Nishina K., Shiozawa S., Maekawa N. The effects of a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 on endotoxin-induced acute kidney injury in mice // *BMC Nephrol.* – 2012. – T. 13. – C. 153.
93. Motrich R. D., Castro G. M., Caputto B. L. Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 1. – C. e53211.
94. Nair R. P., Duffin K. C., Helms C., Ding J., Stuart P. E., Goldgar D., Gudjonsson J. E., Li Y., Tejasvi T., Feng B. J., Ruether A., Schreiber S., Weichenthal M., Gladman D., Rahman P., Schrodi S. J., Prahalad S., Guthery S. L., Fischer J., Liao W., Kwok P. Y., Menter A., Lathrop G. M., Wise C. A., Begovich A. B., Voorhees J. J., Elder J. T., Krueger G. G., Bowcock A. M., Abecasis G. R. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways // *Nat Genet.* – 2009. – T. 41, № 2. – C. 199-204.
95. Nakatsuji T., Gallo R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas // *J Invest Dermatol.* – 2012. – T. 132, № 3 Pt 2. – C. 887-95.
96. Nakayama T., Higuchi T., Oiso N., Kawada A., Yoshie O. Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas // *Anticancer Res.* – 2012. – T. 32, № 4. – C. 1367-73.
97. Nestle F. O., Kaplan D. H., Barker J. Psoriasis // *N Engl J Med.* – 2009. – T. 361, № 5. – C. 496-509.
98. Newberry E. P., Willis D., Latifi T., Boudreaux J. M., Towler D. A. Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element // *Mol Endocrinol.* – 1997. – T. 11, № 8. – C. 1129-44.
99. Oestreicher J. L., Walters I. B., Kikuchi T., Gilleaudeau P., Surette J., Schwertschlag U., Dorner A. J., Krueger J. G., Trepicchio W. L. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling // *Pharmacogenomics J.* – 2001. – T. 1, № 4. – C. 272-87.
100. Paneni F., Osto E., Costantino S., Mateescu B., Briand S., Coppolino G., Perna E., Mocharla P., Akhmedov A., Kubant R., Rohrer L., Malinski T., Camici G. G., Matter C. M., Mechta-Grigoriou F., Volpe M., Luscher T. F., Cosentino F. Deletion of the AP-1 Transcription Factor JunD Induces Oxidative Stress and Accelerates Age-Related Endothelial Dysfunction // *Circulation.* – 2013. CIRCULATIONAHA.112.000826 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000826.
101. Parisi R., Symmons D. P., Griffiths C. E., Ashcroft D. M., Identification, Management of P., Associated Comorbidity project t. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence // *J Invest Dermatol.* – 2013. – T. 133, № 2. – C. 377-85.
102. Piruzian E. S., Sobolev V. V., Abdeev R. M., Zolotarev A. D., Nikolaev A. A., Sarkisova M. K., Sautin M. E., Ishkin A. A., Piruzyan A. L., Ilyina S. A., Korsunskaya I. M., Rahimova O. Y., Bruskin S. A. Study of Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Immune-Mediated Inflammatory Diseases, using Psoriasis As a Model // *Acta Naturae.* – 2009. – T. 1, № 3. – C. 125-35.
103. Raffetto J. D., Khalil R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease // *Biochem Pharmacol.* – 2008. – T. 75, № 2. – C. 346-59.
104. Ray N., Kuwahara M., Takada Y., Maruyama K., Kawaguchi T., Tsubone H., Ishikawa H., Matsuo K. c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin // *Int Immunol.* – 2006. – T. 18, № 5. – C. 671-7.
105. Reischl J., Schwenke S., Beekman J. M., Mrowietz U., Sturzebecher S., Heubach J. F. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques // *J Invest Dermatol.* – 2007. – T. 127, № 1. – C. 163-9.
106. Rieder E., Tausk F. Psoriasis, a model of dermatologic psychosomatic disease: psychiatric implications and treatments // *Int J Dermatol.* – 2012. – T. 51, № 1. – C. 12-26.
107. Riehl A., Nemeth J., Angel P., Hess J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer // *Cell Commun Signal.* – 2009. – T. 7. – C. 12.
108. Ruchusatsawat K., Wongpiyabovorn J., Shuangshoti S., Hirankarn N., Mutirangura A. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis // *J Mol Med (Berl).* – 2006. – T. 84, № 2. – C. 175-82.

109. Ryan C., Kirby B. Psoriasis Is a Systemic Disease with Multiple Cardiovascular and Metabolic Comorbidities // *Dermatol Clin.* – 2015. – T. 33, № 1. – C. 41-55.
110. Sabat R., Philipp S., Hoflich C., Kreutzer S., Wallace E., Asadullah K., Volk H. D., Sterry W., Wolk K. Immunopathogenesis of psoriasis // *Exp Dermatol.* – 2007. – T. 16, № 10. – C. 779-98.
111. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* / Sambrook J., Russell D. W. – Cold Spring Harbour: CSHL Press, 2001. – 2344 c.
112. Schneider M. R. MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease // *Br J Dermatol.* – 2012. – T. 166, № 1. – C. 22-8.
113. Schonthaler H. B., Guinea-Viniegra J., Wagner E. F. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway // *Ann Rheum Dis.* – 2011. – T. 70 Suppl 1. – C. i109-12.
114. Seitz O., Schurmann C., Pfeilschifter J., Frank S., Sader R. Identification of the Fra-1 transcription factor in healing skin flaps transplants: a potential role as a negative regulator of VEGF release from keratinocytes // *J Craniomaxillofac Surg.* – 2012. – T. 40, № 4. – C. 379-86.
115. Shurin M. R., Smolkin Y. S. Immune-mediated diseases: where do we stand? // *Adv Exp Med Biol.* – 2007. – T. 601. – C. 3-12.
116. Smith C. H., Anstey A. V., Barker J. N., Burden A. D., Chalmers R. J., Chandler D. A., Finlay A. Y., Griffiths C. E., Jackson K., McHugh N. J., McKenna K. E., Reynolds N. J., Ormerod A. D. British Association of Dermatologists' guidelines for biologic interventions for psoriasis 2009 // *Br J Dermatol.* – 2009. – T. 161, № 5. – C. 987-1019.
117. Sobolev V. V., Zolotarenko A. D., Soboleva A. G., Sautin M. E., Il'ina S. A., Sarkisova M. K., Golukhova E. Z., Elkin A. M., Bruskin S. A., Abdeev R. M. [Expression of the FOSL1 gene in psoriasis and atherosclerosis] // *Genetika.* – 2010. – T. 46, № 1. – C. 104-10.
118. Sobolev V. V., Zolotorenko A. D., Soboleva A. G., Elkin A. M., Il'ina S. A., Serov D. N., Potekaev N. N., Tkachenko S. B., Minnibaev M. T., Piruzyan A. L. Effects of expression of transcriptional factor AP-1 FOSL1 gene on psoriatic process // *Bull Exp Biol Med.* – 2011. – T. 150, № 5. – C. 632-4.
119. Sonkoly E., Bata-Csorgo Z., Pivarcsi A., Polyanka H., Kenderessy-Szabo A., Molnar G., Szentpali K., Bari L., Megyeri K., Mandi Y., Dobozy A., Kemeny L., Szell M. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 25. – C. 24159-67.
120. Starr A. E., Bellac C. L., Dufour A., Goebeler V., Overall C. M. Biochemical characterization and N-terminomics analysis of leukolysin, the membrane-type 6 matrix metalloprotease (MMP25): chemokine and vimentin cleavages enhance cell migration and macrophage phagocytic activities // *J Biol Chem.* – 2012. – T. 287, № 16. – C. 13382-95.
121. Stevens L. J., Page-McCaw A. A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing // *Mol Biol Cell.* – 2012. – T. 23, № 6. – C. 1068-79.
122. Strange A., Capon F., Spencer C. C., Knight J., Weale M. E., Allen M. H., Barton A., Band G., Bellenguez C., Bergboer J. G., Blackwell J. M., Bramon E., Bumpstead S. J., Casas J. P., Cork M. J., Corvin A., Deloukas P., Dilthey A., Duncanson A., Edkins S., Estivill X., Fitzgerald O., Freeman C., Giardina E., Gray E., Hofer A., Huffmeier U., Hunt S. E., Irvine A. D., Jankowski J., Kirby B., Langford C., Lascorz J., Leman J., Leslie S., Mallbris L., Markus H. S., Mathew C. G., McLean W. H., McManus R., Mossner R., Moutsianas L., Naluai A. T., Nestle F. O., Novelli G., Onoufriadis A., Palmer C. N., Perricone C., Pirinen M., Plomin R., Potter S. C., Pujol R. M., Rautanen A., Riveira-Munoz E., Ryan A. W., Salmhofer W., Samuelsson L., Sawcer S. J., Schalkwijk J., Smith C. H., Stahle M., Su Z., Tazi-Ahmini R., Traupe H., Viswanathan A. C., Warren R. B., Weger W., Wolk K., Wood N., Worthington J., Young H. S., Zeeuwen P. L., Hayday A., Burden A. D., Griffiths C. E., Kere J., Reis A., McVean G., Evans D. M., Brown M. A., Barker J. N., Peltonen L., Donnelly P., Trembath R. C. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1 // *Nat Genet.* – 2010. – T. 42, № 11. – C. 985-90.
123. Stuart P. E., Nair R. P., Ellinghaus E., Ding J., Tejasvi T., Gudjonsson J. E., Li Y., Weidinger S., Eberlein B., Gieger C., Wichmann H. E., Kunz M., Ike R., Krueger G. G., Bowcock A. M., Mrowietz

- U., Lim H. W., Voorhees J. J., Abecasis G. R., Weichenthal M., Franke A., Rahman P., Gladman D. D., Elder J. T. Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci // *Nat Genet.* – 2010. – T. 42, № 11. – C. 1000-4.
124. Sun L. D., Cheng H., Wang Z. X., Zhang A. P., Wang P. G., Xu J. H., Zhu Q. X., Zhou H. S., Ellinghaus E., Zhang F. R., Pu X. M., Yang X. Q., Zhang J. Z., Xu A. E., Wu R. N., Xu L. M., Peng L., Helms C. A., Ren Y. Q., Zhang C., Zhang S. M., Nair R. P., Wang H. Y., Lin G. S., Stuart P. E., Fan X., Chen G., Tejasvi T., Li P., Zhu J., Li Z. M., Ge H. M., Weichenthal M., Ye W. Z., Shen S. K., Yang B. Q., Sun Y. Y., Li S. S., Lin Y., Jiang J. H., Li C. T., Chen R. X., Cheng J., Jiang X., Zhang P., Song W. M., Tang J., Zhang H. Q., Sun L., Cui J., Zhang L. J., Tang B., Huang F., Qin Q., Pei X. P., Zhou A. M., Shao L. M., Liu J. L., Zhang F. Y., Du W. D., Franke A., Bowcock A. M., Elder J. T., Liu J. J., Yang S., Zhang X. J. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population // *Nat Genet.* – 2010. – T. 42, № 11. – C. 1005-9.
125. Swindell W. R., Johnston A., Voorhees J. J., Elder J. T., Gudjonsson J. E. Dissecting the psoriasis transcriptome: inflammatory- and cytokine-driven gene expression in lesions from 163 patients // *BMC Genomics.* – 2013. – T. 14. – C. 527.
126. Swindell W. R., Xing X., Voorhees J. J., Elder J. T., Johnston A., Gudjonsson J. E. Integrative RNA-seq and microarray data analysis reveals GC content and gene length biases in the psoriasis transcriptome // *Physiol Genomics.* – 2014. – T. 46, № 15. – C. 533-46.
127. Takagi S., Simizu S., Osada H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription // *Cancer Res.* – 2009. – T. 69, № 4. – C. 1502-8.
128. Tariq M. A., Kim H. J., Jejelowo O., Pourmand N. Whole-transcriptome RNAseq analysis from minute amount of total RNA // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – T. 39, № 18. – C. e120.
129. Tian S., Krueger J. G., Li K., Jabbari A., Brodmerkel C., Lowes M. A., Suarez-Farinas M. Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the "core" pathogenesis of disease // *PLoS One.* – 2012. – T. 7, № 9. – C. e44274.
130. Tiscornia G., Singer O., Verma I. M. Production and purification of lentiviral vectors // *Nat Protoc.* – 2006. – T. 1, № 1. – C. 241-5.
131. Torma H. Regulation of keratin expression by retinoids // *Dermatoendocrinol.* – 2011. – T. 3, № 3. – C. 136-40.
132. Tower G. B., Coon C. I., Belguise K., Chalbos D., Brinckerhoff C. E. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter // *Eur J Biochem.* – 2003. – T. 270, № 20. – C. 4216-25.
133. Tsoi L. C., Spain S. L., Knight J., Ellinghaus E., Stuart P. E., Capon F., Ding J., Li Y., Tejasvi T., Gudjonsson J. E., Kang H. M., Allen M. H., McManus R., Novelli G., Samuelsson L., Schalkwijk J., Stahle M., Burden A. D., Smith C. H., Cork M. J., Estivill X., Bowcock A. M., Krueger G. G., Weger W., Worthington J., Tazi-Ahnini R., Nestle F. O., Hayday A., Hoffmann P., Winkelmann J., Wijmenga C., Langford C., Edkins S., Andrews R., Blackburn H., Strange A., Band G., Pearson R. D., Vukcevic D., Spencer C. C., Deloukas P., Mrowietz U., Schreiber S., Weidinger S., Koks S., Kingo K., Esko T., Metspalu A., Lim H. W., Voorhees J. J., Weichenthal M., Wichmann H. E., Chandran V., Rosen C. F., Rahman P., Gladman D. D., Griffiths C. E., Reis A., Kere J., Nair R. P., Franke A., Barker J. N., Abecasis G. R., Elder J. T., Trembath R. C. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity // *Nat Genet.* – 2012. – T. 44, № 12. – C. 1341-8.
134. Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation // *Histol Histopathol.* – 2000. – T. 15, № 3. – C. 921-8.
135. Urlinger S., Baron U., Thellmann M., Hasan M. T., Bujard H., Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – T. 97, № 14. – C. 7963-8.
136. Vaidya M. M., Kanojia D. Keratins: markers of cell differentiation or regulators of cell differentiation? // *J Biosci.* – 2007. – T. 32, № 4. – C. 629-34.

137. Vaz M., Machireddy N., Irving A., Potteti H. R., Chevalier K., Kalvakolanu D., Reddy S. P. Oxidant-induced cell death and Nrf2-dependent antioxidative response are controlled by Fra-1/AP-1 // *Mol Cell Biol.* – 2012. – T. 32, № 9. – C. 1694-709.
138. Vogel C., Marcotte E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses // *Nat Rev Genet.* – 2012. – T. 13, № 4. – C. 227-32.
139. Wancket L. M., Frazier W. J., Liu Y. Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 in immunology, physiology, and disease // *Life Sci.* – 2012. – T. 90, № 7-8. – C. 237-48.
140. Welter J. F., Crish J. F., Agarwal C., Eckert R. L. Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity // *J Biol Chem.* – 1995. – T. 270, № 21. – C. 12614-22.
141. Wojas-Pelc A., Marcinkiewicz J. What is a role of haeme oxygenase-1 in psoriasis? Current concepts of pathogenesis // *Int J Exp Pathol.* – 2007. – T. 88, № 2. – C. 95-102.
142. Wu L., Tanimoto A., Murata Y., Sasaguri T., Fan J., Sasaguri Y., Watanabe T. Matrix metalloproteinase-12 gene expression in human vascular smooth muscle cells // *Genes Cells.* – 2003. – T. 8, № 3. – C. 225-34.
143. Wu T., Hua X. Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation // *Am J Cancer Res.* – 2011. – T. 1, № 6. – C. 726-39.
144. Xia J., Joyce C. E., Bowcock A. M., Zhang W. Noncanonical microRNAs and endogenous siRNAs in normal and psoriatic human skin // *Hum Mol Genet.* – 2013. – T. 22, № 4. – C. 737-48.
145. Yan C., Boyd D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression // *J Cell Physiol.* – 2007. – T. 211, № 1. – C. 19-26.
146. Yang W. S., Jeong D., Nam G., Yi Y. S., Yoon D. H., Woong Kim T., Chul Park Y., Hwang H., Rhee M. H., Hong S., Cho J. Y. AP-1 pathway-targeted inhibition of inflammatory responses in LPS-treated macrophages and EtOH/HCl-treated stomach by *Archidendron clypearia* methanol extract // *J Ethnopharmacol.* – 2013.10.1016/j.jep.2013.01.034.
147. Yao Y., Richman L., Morehouse C., de los Reyes M., Higgs B. W., Boutrin A., White B., Coyle A., Krueger J., Kiener P. A., Jallal B. Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? // *PLoS One.* – 2008. – T. 3, № 7. – C. e2737.
148. Ye L., Lv C., Man G., Song S., Elias P. M., Man M. Q. Abnormal epidermal barrier recovery in uninvolved skin supports the notion of an epidermal pathogenesis of psoriasis // *J Invest Dermatol.* – 2014. – T. 134, № 11. – C. 2843-6.
149. Young M. R., Colburn N. H. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention // *Gene.* – 2006. – T. 379. – C. 1-11.
150. Zhang J., Betson M., Erasmus J., Zeikos K., Bailly M., Cramer L. P., Braga V. M. Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations // *J Cell Sci.* – 2005. – T. 118, № Pt 23. – C. 5549-62.
151. Zhang K., Zhang R., Li X., Yin G., Niu X. Promoter methylation status of p15 and p21 genes in HPP-CFCs of bone marrow of patients with psoriasis // *Eur J Dermatol.* – 2009. – T. 19, № 2. – C. 141-6.
152. Zhang P., Su Y., Lu Q. Epigenetics and psoriasis // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2012. – T. 26, № 4. – C. 399-403.
153. Zhang P., Su Y., Zhao M., Huang W., Lu Q. Abnormal histone modifications in PBMCs from patients with psoriasis vulgaris // *Eur J Dermatol.* – 2011. – T. 21, № 4. – C. 552-7.
154. Zhang Q., Sakamoto K., Wagner K. U. D-type Cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells // *Mol Cell Endocrinol.* – 2014. – T. 382, № 1. – C. 583-92.
155. Zhang X. J., Huang W., Yang S., Sun L. D., Zhang F. Y., Zhu Q. X., Zhang F. R., Zhang C., Du W. H., Pu X. M., Li H., Xiao F. L., Wang Z. X., Cui Y., Hao F., Zheng J., Yang X. Q., Cheng H., He C. D., Liu X. M., Xu L. M., Zheng H. F., Zhang S. M., Zhang J. Z., Wang H. Y., Cheng Y. L., Ji B. H., Fang Q. Y., Li Y. Z., Zhou F. S., Han J. W., Quan C., Chen B., Liu J. L., Lin D., Fan L., Zhang A. P.,

- Liu S. X., Yang C. J., Wang P. G., Zhou W. M., Lin G. S., Wu W. D., Fan X., Gao M., Yang B. Q., Lu W. S., Zhang Z., Zhu K. J., Shen S. K., Li M., Zhang X. Y., Cao T. T., Ren W., Zhang X., He J., Tang X. F., Lu S., Yang J. Q., Zhang L., Wang D. N., Yuan F., Yin X. Y., Huang H. J., Wang H. F., Lin X. Y., Liu J. J. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21 // *Nat Genet.* – 2009. – T. 41, № 2. – C. 205-10.
156. Zhang Z. H., Jhaveri D. J., Marshall V. M., Bauer D. C., Edson J., Narayanan R. K., Robinson G. J., Lundberg A. E., Bartlett P. F., Wray N. R., Zhao Q. Y. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 8. – C. e103207.
157. Zhivotovsky B., Orrenius S. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future // *J Intern Med.* – 2010. – T. 268, № 5. – C. 395-409.
158. Zhou X., Krueger J. G., Kao M. C., Lee E., Du F., Menter A., Wong W. H., Bowcock A. M. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array // *Physiol Genomics.* – 2003. – T. 13, № 1. – C. 69-78.