

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.218

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ МУТАГЕНЕЗ В МЫШАХ: В ПОИСКАХ ГЕНОВ,
РЕГУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ВОСПАЛЕНИЕ

© 2020 г. И. В. Астраханцева^{1, 2, *}, А. Н. Томилин³, В. С. Тарабыкин^{4, 5}, С. А. Недоспасов^{1, 6, 7, **}

¹Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354349 Россия

²Институт биологии и биомедицины, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

³Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁴Институт нейронаук, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

⁵Институт клеточной биологии и нейробиологии, медицинский факультет Шарите, Берлин, 10117 Германия

⁶Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

⁷Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: astrakhantsevairina@gmail.com

**e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2020 г.

После доработки 26.05.2020 г.

Принята к публикации 09.06.2020 г.

Полногеномный мутагенез с помощью N-этил-N-нитрозомочевина (ENU) позволяет достаточно эффективно вносить мутации в геном сперматогониальных клеток млекопитающих. Это свойство используется для получения животных с фенотипами, связанными с патологией различных функциональных систем организма. В частности, с помощью этой методологии удалось выявить молекулярные механизмы иммунного ответа, выявить гены, регулирующие развитие различных органов, и т.п. В миниобзоре проведен анализ генетических исследований иммунологических и воспалительных реакций в мышцах, подвергнутых ENU-мутагенезу, которые привели к важным открытиям регуляции основных сигнальных путей врожденного и адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: N-этил-N-нитрозомочевина, полногеномный мутагенез, “прямая генетика”, сигналинг, иммуногенетика.

DOI: 10.31857/S0016675820120024

Методология случайного полногеномного мутагенеза для изучения связи фенотипа с генотипом изначально была апробирована на фруктовых мушках и нематодных червях, что, в частности, позволило построить первую карту генома *Drosophila* [1]. В качестве мутагена во многих ранних исследованиях применяли различные виды ионизирующего излучения. Однако организм млекопитающих имеет эффективные механизмы, способные защитить сперматогонию от воздействия различных мутагенов [2, 3]. По этой причине было необходимо найти достаточно эффективный мутаген, позволяющий изучать роль индивидуальных генов в развитии определенных фенотипических признаков.

В 70-е годы Рассел обнаружил, что химический мутагенез с использованием N-этил-N-нитрозомочевина (ENU) позволяет вызвать мутации в сперматогониальных клетках мышей с частотой

$\sim 150 \times 10^{-5}$ на локус, что превышало эффективность таких мутагенов как рентгеновское излучение и хлорамбуцил [4–6]. Отметим, что спонтанные мутации у мышей, связанные со сбоями систем репликации и репарации, случаются с достаточно низкой частотой ($\sim 5 \times 10^{-6}$ на локус).

ENU является алкилирующим агентом, который переносит свою этильную группу на радикалы кислорода или азота в молекуле ДНК, а именно на N-1, N-3 и N-7 атомы аденина, O-2 и N-3 атомы цитозина, N-3, O-6 и N-7 атомы гуанидина, O-2, N-3 и O-4 атомы тимина, а также на фосфатные группы каркаса ДНК [7]. Наибольшая частота мутаций наблюдается в пре-мейотических сперматогониальных стволовых клетках. Исследования показали, что ENU преимущественно вызывает однонуклеотидные замены, модифицируя пары оснований А/Т: в 44% случаев это замены А/Т →

→ Т/А, в 38% – А/Т → G/C, в 8% – G/C → А/Т, в 5% – А/Т → C/G, в 3% – G/C → C/G и в 2% – G/C → Т/А. Оценено, что в 64% мутагенез приводит к миссенс-мутациям в белковом продукте, в 26% – к ошибкам сплайсинга мРНК и в 10% – к нонсенс-мутациям [8]. Таким образом, ENU-мутагенез стал одним из эффективных методов “прямой генетики”, нацеленным на идентификацию генов, ответственных за определенные фенотипы [9].

Настоящий миниобзор посвящен генетическим исследованиям регуляции иммунологических и воспалительных реакций с помощью полногеномного ENU-мутагенеза в мышцах, которые были реализованы в трех крупных международных проектах.

РЕГУЛЯЦИЯ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ

В лаборатории В. Beutler, где ранее была идентифицирована мутация в гене толл-подобного рецептора 4 (TLR4) как причина толерантности мышцей к липополисахариду (ЛПС) [10], использовали ENU-мутагенез для изучения регуляции врожденного иммунного ответа и воспаления. В течение четырех лет, используя в качестве параметра скрининга дефектную продукцию TNF клетками крови *in vitro*, было идентифицировано 56 мутантных линий с дефектами в реакциях врожденного иммунитета. Мутации в 17 линиях были картированы до единичного хромосомного локуса на хромосоме, а для 12 из них была идентифицирована мутация, ответственная за фенотип [11]. В некоторых случаях идентифицированные гены и мутации подтвердили результаты, полученные другими авторами (в частности, методами “обратной генетики”).

Так, при изучении мутантной линии мышцей *Lps2*, которая характеризовалась нечувствительностью к стимуляции как ЛПС, так и дцРНК (но при сохранении ответа на другие лиганды TLRs), был открыт MyD88-независимый путь сигналинга [12]. Мутация *Lps2* является результатом делеции одной пары оснований в дистальной области, кодирующей TLR активатор гена IFN (*trif*). TRIF необходим как для TLR3, так и для TLR4 сигналинга и является важной адаптерной молекулой, участвующей в синтезе IFN- β ниже TLR4. Исследования на микрочипах показали, что примерно половина всех ЛПС-индуцированных белков, по крайней мере частично, зависит от TRIF. Кроме того, оказалось, что TRIF является единственной адаптерной молекулой для TLR3, опосредующей активацию NF- κ B и MAP-киназ [13, 14].

У линии мышцей с фенотипом *Triple D (3d)* была нарушена продукция TNF в ответ на стимуляцию TLR3 с помощью poly (I:C), TLR7 с помощью резиквинода и TLR9 с помощью неметилированных олигонуклеотидов ДНК, содержащих CpG-мотив, но при этом наблюдался нормальный ответ на стимуляцию ЛПС, липотейхоевой кислотой и ди- и три-ацилированными бактериальными липопептидами [15]. Кроме того, гомозиготные мышцей линии *3d* имели также дефект в презентации чужих антигенов (отсутствовала кросс-презентация и презентация ГКГ класса II) и отличались повышенной чувствительностью к инфекции мышечным цитомегаловирусом (MCMV), которая активирует врожденный иммунитет через оси TLR3 → TRIF и TLR9 → MyD88. Мутация, являющаяся причиной такого фенотипа, была картирована в 9-м экзоне гена *UNC93b1*, кодирующего белок UNC-93B, и вызывала изменения в 412-й позиции (H412R), что вело к конформационным изменениям этого белка [16]. Позже было показано, что UNC-93B “дикого типа”, в отличие от H412R, физически взаимодействует с TLR3, 5, 7, 9 и 13, локализуется в эндоплазматическом ретикулуме [17, 18] и контролирует транспорт TLR7, 9, 11, 12 и 13 из эндоплазматического ретикулума [19, 20].

Еще более тяжелое протекание MCMV наблюдалось у линии мышцей с мутацией *CpG1*. При секвенировании кодирующей области *tlr9* в положении 1496 наблюдалась замена T → C, соответствующая аминокислотной замене L499P. Это приводило к потере ответа мутантного рецептора TLR9 на стимуляции CpG-ODN [21], т.е. мутация вызывала нарушения активации MyD88-зависимого сигнального пути.

Были отобраны еще несколько мутантных мышцей с фенотипом, затрагивающим сигналинг через MyD88. Так, у мышцей *Pococurante (Poc)* отсутствовала передача сигналов MyD88, за исключением сигналов, исходящих от гетеродимера TLR2/TLR6. Конкретно, не индуцировался сигнал зимозаном и липотейхоевой кислотой, но при этом был нормальный ответ на MALP-2 или PAM2CSK4, которые могут сигнализировать как через TLR2/TLR6, так и через TLR2. У другой мутантной линии *Insouciant (Int)* точечная мутация в эктодомене TLR6 (V327A) отменяла передачу сигналов от зимозана, липотейхоевой кислоты и MALP-2, но не от PAM2CSK4. У мышцей *Lackadaisical (Lkd)*, напротив, наблюдался нормальный сигналинг через MyD88, за исключением сигналов от TLR7 и TLR9, которые были заметно снижены. Оказалось, что *Poc* и *Lkd* являются миссенс-мутациями в гене адаптерного белка MyD88. Мутация *Poc* (I179N) меняла аминокислоту на поверхности TIR-домена MyD88, тогда

как мутация *Lkd* (Y116C) влияла на структуру олигопептидной цепи между доменом смерти и доменом TIR. Предположительно некоторые лиганды TLR2/TLR6 и TLR2 (MALP-2 и PAM2CSK4) вызывают конформационные изменения в рецепторе, которые каким-то образом способствуют ассоциации MyD88 с рецепторным комплексом. Хотя большинство TLR ассоциируются с MyD88 так, что и ВВ-петля, и Рос-сайт включаются в сигнальный интерфейс, диацилированные липопептиды (MALP-2 и PAM2CSK4) могут запускать и другую форму активации. Таким образом, анализ этих мутантных линий показал, что MyD88 имеет два разных способа передачи внутриклеточного сигнала [22, 23].

Кроме того, еще несколько мутантных линий мышей показывали сниженный ответ на различные бактериальные индукторы.

Так, *Oblivious* (*Obl*) фенотип характеризовался сниженной продукцией TNF в ответ на липотейхоевую кислоту грамположительных бактерий и на MALP2, являющиеся специфическими лигандами гетеродимерного комплекса TLR2/TLR6. *Obl* гомозиготы показали повышенную восприимчивость к инфекциям *Staphylococcus aureus in vivo*. *Obl* фенотип был картирован в одном локусе на хромосоме 5, где ранее были аннотированы пять генов-кандидатов. Все кандидаты были секвенированы на уровне кДНК, что позволило определить нонсенс-мутацию в дистальной части кодирующей области гена *cd36* [11], хотя ранее функцию CD36 не связывали с TLRs и иммунитетом [24].

Макрофаги гомозиготных мышей линии *Heedless* (*Hdl*) продуцировали TNF в ответ на активацию липидом А и ЛПС без О-антигена, но не отвечали на ЛПС, состоящий из всех трех регионов (липид А, центральный олигосахарид и О-антиген). Более того, мутация *Hdl* блокировала TRAM-TRIF-зависимую передачу сигналов в ответ на ЛПС и ингибировала активацию специфическими лигандами гетеродимера TLR2/TLR6. Эта мутация была картирована на 18-й хромосоме в гене *cd14* и была связана с делецией 83 аминокислот с С-конца, которые формировали второй богатый лейцином LRR домен CD14. Тем самым было выявлено, что CD14 необходим для ЛПС-индуцированного рекрутирования TRIF и TRAM и последующей активации IRF-3; кроме того, CD14 требуется и для активации комплекса TLR2/TLR6 [22, 25].

Фенотип *PanR1* отличался отсутствием биологических эффектов TNF в ответ на любую активацию TLR рецепторов. Эта мутация была картирована в самом локусе *tnf* и представляла собой миссенс-аллель (P138T), в результате чего му-

тантный тример TNF не мог эффективно связываться с рецептором TNF p55. Интересно, что мыши *PanR1*, в отличие от мышей с полным дефицитом TNF, имели нормальное развитие лимфоидных органов, включая Пейеровы бляшки, и нормальное развитие В-клеток маргинальной зоны селезенки. Предположительно низкий уровень активности TNF, сохраняющийся у гомозиготных мутантов *PanR1*, но не у нокаутных мышей, был достаточным для развития лимфоидной системы [22, 26].

Наконец, у мышей линии *Feckless* (*Fls*) в ответ на дцПНК не активировался NF-κB, однако инициировалась продукция IFN-β. Было показано, что *Fls* может взаимодействовать с TRAM по независимому пути, что приводило к активации транскрипционного фактора IRF-7 [22]. Секвенирование выявило миссенс-мутацию T → C в положении 82712061 в хромосоме 10. Мутация приводила к замене триптофана на аргинин в аминокислоте 296 белка HCFC2. Этот белок образует комплексы с транскрипционными факторами IRF2 и IRF1, облегчая их связывание с IRF элементом гена *tlr3*, после чего HCFC2 высвобождает эти IRF [27].

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

В лаборатории С. Goodnow был проведен полногеномный ENU-мутационный скрининг мышей C57Bl/6 и в третьем поколении получено 20 мутантных линий мышей с различными иммунологическими аномалиями, включая полное отсутствие Т-клеток или их некоторых субпопуляций, дефицит Т- и/или В-клеток, гиперактивность Т-клеток и гипергаммаглобулинемию [28]. При этом у 11 линий мутантных мышей имелись дефекты в развитии и дифференцировке Т-клеток [29].

Так, *Plastic* (*Plste*) фенотип характеризовался развитием у животных в F₁ лейкемии/лимфом в возрасте четырех месяцев, что свидетельствовало о доминантном характере мутации. Мутация была картирована на 11-й хромосоме в гене транскрипционного фактора Ikaros, где была обнаружена точечная замена А → G в позиции 572, что приводило к замене гистидина на аргинин в кодоне 191. Эта замена нарушала четвертичную структуру N-конца цинковых пальцев 3 Ikaros, которые и отвечают за связывание с ДНК [30]. Ранее было показано, что Ikaros участвует в созревании Т и В лимфоцитов и НК клеток [31]. Индуцированный ENU аллель *ikaros^{plastic}* приводил к дефектам в образовании и других типов клеток крови, включая эритроциты, гранулоциты и макрофаги. Биохимическими исследованиями было установлено,

что аллель *ikaros^{plastic}* устраняет способность Ikaros связываться с ДНК, но не влияет на способность образовывать димеры с другими белками. Интересно, что в этом случае изменение всего лишь одной пары оснований приводило к более тяжелому фенотипу, чем делеция всего гена [30].

Кроме того, была охарактеризована мутантная линия *Twimp (Twp)*, где гипоморфный аллель адаптера передачи сигналов Т-клеток Slp76 сохранял свои функции в морфогенезе сосудов, но не в развитии Т-лимфоцитов. Так, была частично ограничена роль Slp76 в дифференцировке Т-клеток и не происходило ингибирующего действия на Т-клетки, в результате чего у животных развивались парадоксальный аутоиммунитет и аллергия [29]. Мутация представляла собой замену Т → G в интроне 12 гена *lcp2*. Анализ кДНК *lcp2* из спленоцитов *Twimp* выявил присутствие как транскрипта дикого типа, так и aberrантного транскрипта без экзона 12. У таких мышей в тимусе была резко снижена селекция Т-клеток CD4⁺Foxp3⁺, однако их количество на периферии иммунной системы было нормальным. Резкое увеличение пролиферации из ограниченного пула лимфоцитов тимуса могло приводить к истощению регуляторной функции и снижению экспрессии CD25 на периферических Foxp3⁺ Lcp2^{twp/twp} клетках [32].

У нескольких линий мышей были определены различные нарушения в субпопуляциях Т- и/или В-клеток. Так, *Unmodulated* линия мутантных мышей характеризовалась небольшими изменениями в уровнях циркулирующих субпопуляций Т- и В-клеток, но значительным снижением их активации под действием определенных стимулов и последующей продукции антител. Это было связано с одиночной заменой Т → А, приводящей к замене аминокислоты L298Q в СС-домене CARMA1/CARD11, члена семейства MAGUK. CARMA1 служит каркасом для сборки сигнального комплекса других белков через несколько доменов для белок-белковых взаимодействий: CARD, СС, PDZ, SH3 и GUK. Поскольку СС-домены участвуют в фолдинге, димеризации или мультимеризации белков путем формирования пучков переплетенных α-спиралей, замена могла предотвращать сборку высокомолекулярных сигнальных каркасов высшего порядка или могла препятствовать связыванию с другим белком. Биохимическими последствиями мутации являлись полная потеря фосфорилирования критического адаптера, Bcl10, связывающегося с сигнальным каскадом NF-κB, и снижение активации сигнальных путей NF-κB и JNK при стимуляции рецептора [29]. Таким образом, *Unmodulated* аллель

выявил дополнительную роль белка CARMA1 в ингибировании сигнальных активационных каскадов.

Кроме этого, в мышцах линии *Xander (Xdr)* была обнаружена мутация в гене, кодирующем транскрипционный фактор NF-κB2, которая располагалась в интроне и вызывала aberrантный сплайсинг РНК, так что в результате образовывался нефункциональный белок NF-κB2. Анализ показал, что эта мутация вызывает дефицит В-клеток, который проявляется после стадии Т1 созревания в селезенке, приводит к значительному сокращению фолликулярной популяции и популяции маргинальной зоны в селезенке, лимфатических узлах и периферической крови. Таким образом, было установлено, что аккумуляция этих популяций В-клеток и есть первичная функция NF-κB2 [33].

Анализ другой, выявленной с помощью ENU-мутагенеза, линии мышей *Sanroque* [29] помог идентифицировать новый ген *roquin*, кодирующий убиквитинлигазу E3 RING-типа, которая играет важную роль в предотвращении развития аутоиммунитета. Этот фермент необычен тем, что содержит РНК-связывающий тип цинкового пальца и локализуется в цитоплазматических гранулах, которые контролируют стабильность и трансляцию мРНК. Этот ген высоко консервативен, начиная с беспозвоночных, однако ранее его функции ничего не было известно. Мутация в гене *roquin* раскрыла новый механизм ингибирования развития Т-клеток путем репрессии рецептора ICOS, который и контролирует их дифференцировку в субпопуляцию фолликулярных Т-клеток-хелперов [29, 34].

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПОВ, СВЯЗАННЫХ СО СПОНТАННЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ

Лаборатория Goodnow и лаборатория Hrabé de Angelis принимали участие в иммунологической части масштабного ENU-скрининга, главной целью которого являлось исследование пороков развития иммунной системы и дефектов иммунных эффекторных функций [35]. В этом проекте было выявлено несколько новых мутантных линий мышей, развивавших спонтанное воспаление.

Так, линия мышей *Ali5* характеризовалась доминантным спонтанным опуханием и воспалением лап; кроме того, у 50% мышей детектировалось аномально высокое соотношение Т-клеток к зрелым В-клеткам. Мутация была картирована на 8-й хромосоме в экзоне 27 гена *plcg2* и приводила к единственной аминокислотной замене аспара-

Таблица 1. Линии мышей с иммунологическими аномалиями, полученные с помощью ENU-мутагенеза

Название линии	Фенотип	Хромосома	Ген	Мутация	Литература
<i>Lps2</i>	Нечувствительность к стимуляции ЛПС и дцRNA	17	<i>trif</i>	Делеция одной пары оснований в дистальной области	[12–14]
<i>Triple D (3d)</i>	Нарушение продукции TNF	19	<i>unc93b1</i>	H412R	[15–20]
<i>CpG1</i>	Тяжелое протекание MCMV	9	<i>tlr9</i>	L499P	[21]
<i>Pococurante (Poc)</i>	Активация TLRs посредством MALP-2 и PAM2CSK4, но не зимозана и LTA	9	<i>myd88</i>	I179N	[22, 23]
<i>Insouciant (Int)</i>	Активация TLRs посредством PAM2CSK4, но не зимозана, LTA и MALP-2	5	<i>tlr6</i>	V327A	[22]
<i>Lackadaisical (Lkd)</i>	Снижение сигналов от TLR7 и TLR9	9	<i>myd88</i>	Y116C	[22]
<i>Oblivious (Obl)</i>	Повышенная восприимчивость к <i>S. aureus</i>	5	<i>cd36</i>	Нонсенс-мутация в дистальной области	[11]
<i>Heedless (Hdl)</i>	Нарушение продукции TNF	18	<i>cd14</i>	Делеция 83 аминокислот на С-конце	[22, 25]
<i>PanR1</i>	Снижение эффектов TNF	17	<i>tnf</i>	P138T	[22, 26]
<i>Feckless (Fls)</i>	Снижение чувствительности к dsPHK	10	<i>hcfc2</i>	W296R	[22, 27]
<i>Plastic (Plstc)</i>	Развитие лейкемии/лимфом	11	<i>ikaros</i>	H191R	[30]
<i>Twimp (Twp)</i>	Парадоксальный аутоиммунитет и аллергия	11	<i>lcp2</i>	T → G в интроне 12	[29, 32]
<i>Unmodulated</i>	Изменения в циркулирующих субпопуляциях Т- и В-клеток	5	<i>carma1/card11</i>	L298Q	[29]
<i>Xander (Xdr)</i>	Дефицит В-клеток	19	<i>nfkb2</i>	–	[33]
<i>Sanroque</i>	Спонтанный аутоиммунитет	1	<i>roquin</i>	–	[29, 34]
<i>Ali5</i>	Спонтанный отек и воспаление лап	8	<i>plcg2</i>	D993G	[36, 37]
<i>Ali14</i>	Спонтанный отек лап и покраснение ушей	8	<i>plcg2</i>	Y495C	[38, 37]
<i>Ali18</i>	Развитие покраснения и отек пальцев задних лап	4	<i>fgr</i>	D502G	[39]
<i>Lupo (Lp)</i>	Хроническое воспаление лап и кожи	18	<i>mayp/pstpip2</i>	I282N	[41, 42]
<i>Paradox (Prdx)</i>	Невосприимчивость к ЛПС/Д-гал, но чувствительность к летальному тесту TNF/Д-гал	Не определено	Не определено	Не определено	[46]
<i>Fearless (Frls)</i>	Невосприимчивость как к ЛПС/Д-гал, так и к летальному тесту TNF/Д-гал	Не определено	Не определено	Не определено	[45]

гиновой кислоты глицином в позиции 993 (D993G) белка фосфолипаза С гамма 2 (Plcg2). Было установлено, что в ответ на активацию В-клеточного рецептора (BCR) в стимулированных клетках увеличивается продукция инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и кальция [36]. Позже было найдено, что замена отрицательно заряженного остатка D на G после активации облегчает взаимодействие PLC γ с мембраной посредством стимуляции EGF или связывания с Ras [37].

Ali14 линия мышей имела сходные характеристики с описанной выше линией *Ali5* – спонтанное опухание лап и покраснение ушей. Эта мутация была полудоминантной и была также картирована в том же гене *plcg2* на 8-й хромосоме, но в 16-м экзоне, и представляла собой замену АТ → GC в spPH домене. Это вело к замене тирозина на цистеин в позиции 495 [38] в домене spPH, что прямо или косвенно способствовало формированию ингибиторной петли PLC β 2. Таким образом, мутации типа *Ali14* могут имитировать конформационные изменения, вызванные взаимодействием с регуляторными молекулами, тем самым обходя потребность в фосфорилировании остатков тирозина, необходимых для активации [37].

Мыши фенотипа *Ali18* в возрасте семи недель отличались покраснением и опуханием пальцев задних лап [39]. Миссенс-мутация (A → G), соответствующая данному фенотипу, была картирована в позиции 1506 гена, кодирующего белок Fgf, члена киназ семейства Src. Данная мутация вызывала аминокислотную замену D502G в терминальном конце каталитического домена Fgf. Таким образом, оказалось, что тирозинкиназа Fgf является внутриклеточной сигнальной молекулой, участвующей в патогенезе аутовоспалительных заболеваний костей. Нарушение регуляции конформационных изменений белка Fgf приводит к остеомиелиту как у мышей, так и у людей [40].

Наконец, линия мышей *Lupo (Lp)* в возрасте шести недель спонтанно развивала хроническое воспаление лап и кожи. Эта мутация в кодирующей области локуса *mypp/pstpip2* на хромосоме 18 приводила к аминокислотной замене I282N белка МАУР [41]. МАУР специфичен для макрофагов и регулирует морфологию и подвижность макрофагов в ответ на сигналинг через CSF-1R. МАУР контролирует организацию актина в мембранные структуры, в том числе регулирует образование филоподий, а также взаимодействует с белками, регулирующими полимеризацию актина [42]. Низкий уровень МАУР связан с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов макрофагами,

приводящей к некрозу тканей и разрушению костей [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С 1997 г. был реализован ряд масштабных проектов полногеномного ENU-мутагенеза на базе нескольких лабораторий в разных странах, которые различались по критериям скрининга. В рамках этих проектов было получено много новой информации о роли конкретных генов в регуляции иммунных реакций, однако некоторые фенотипы так и остались нерасшифрованными, в частности из-за трудоемкости генетического картирования. В последнее десятилетие с появлением секвенирования нового поколения было продолжено изучение мутантных линий, полученных в начале 2000-х гг. Новые методы значительно упростили процедуру нахождения мутаций, что в совокупности с развитием технологии CRISPR/Cas9 позволяет более эффективно определять и верифицировать роль мутаций в формировании фенотипа [43, 44].

В 2015 г. на базе ННГУ им. Н.И. Лобачевского был запущен первый российский проект ENU-мутагенеза для поиска нейробиологических и иммунологических фенотипов. На текущий момент отобрано пять линий мышей с иммунологическим фенотипом, которые были нечувствительны к модельному септическому шоку [45, 46], и 13 линий мышей с нейробиологическими фенотипами (в частности, микроцефалией, предрасположенностью к эпилепсии и нарушением моторных функций) [47]. В настоящее время ведется поиск мутаций, приводящих к указанным фенотипическим аномалиям (табл. 1).

Работа авторов поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 17-00-00327.

Настоящий обзор не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящий обзор не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* // Nature. 1980. V. 287. P. 795–801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>

2. *Russell W.L., Russell L.B., Cupp M.B.* Dependence of mutation frequency on radiation dose rate in female mice // *PNAS USA*. 1959. V. 45. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1073/pnas.45.1.18>
3. *Iyama T., Wilson D.M. 3rd.* DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, DNA Repair // *Amst.* 2013. V. 12. P. 620–636.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>
4. *Russell L.B., Hunsicker P.R., Cacheiro N.L. et al.* Chlorambucil effectively induces deletion mutations in mouse germ cells // *PNAS USA*. 1989. V. 86. P. 3704–3708.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3704>
5. *Russell W.L., Kelly E.M., Hunsicker P.R. et al.* Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse // *PNAS USA*. 1979. V. 76. P. 5818–5819.
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5818>
6. *Cordes S.P.* N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005. V. 69. P. 426–439.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.426-439.2005>
7. *Probst F.J., Justice M.J.* Mouse mutagenesis with the chemical supermutagen ENU // *Methods Enzymol.* 2010. V. 477. P. 297–312.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)77015-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)77015-4)
8. *Justice M.J., Noveroske J.K., Weber J.S. et al.* Mouse ENU mutagenesis // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. P. 1955–1963.
<https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1955>
9. *Белоногова Н.М.* “Прямая” и “обратная” генетика. Генетика количественных признаков // *Вавиловский журн. генетики и селекции*. 2014. Т. 18. С. 147–157.
10. *Poltorak A., He X., Smirnova I. et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *tlr4* gene // *Science*. 1998. V. 282. P. 2085–2088.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>
11. *Hoebe K., Beutler B.* Unraveling innate immunity using large scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis // *Tissue Antigens*. 2005. V. 65 P. 395–401.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00369.x>
12. *Yamamoto M., Sato S., Hemmi H. et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway // *Science*. 2003. V. 301. P. 640 – 643.
<https://doi.org/10.1126/science.1087262>
13. *Hoebe K., Du X., Georgel P. et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling // *Nature*. 2003. V. 424. P. 743–748.
<https://doi.org/10.1038/nature01889>
14. *Weighardt H., Jusek G., Mages J. et al.* Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* 2004. V. 34. P. 558–564.
<https://doi.org/10.1002/eji.200324714>
15. *Hoebe K., Janssen E.M., Kim S.O. et al.* Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. P. 1223–1229.
<https://doi.org/10.1038/ni1010>
16. *Tabeta K., Hoebe K., Janssen E.M. et al.* The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9 // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. P. 156–164.
<https://doi.org/10.1038/ni1297>
17. *Brinkmann M.M., Spooner E., Hoebe K. et al.* The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling // *J. Cell Biol.* 2007. V. 177. P. 265–275.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200612056>
18. *Huh J.-W., Shibata T., Hwang M. et al.* UNC93B1 is essential for the plasma membrane localization and signaling of Toll-like receptor 5 // *PNAS USA*. 2014. V. 111. P. 7072–7077.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1322838111>
19. *Kim Y.-M., Brinkmann M.M., Paquet M.-E., Ploegh H.L.* UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes // *Nature*. 2008. V. 452. P. 234–238.
<https://doi.org/10.1038/nature06726>
20. *Lee B.L., Moon J.E., Shu J.H. et al.* UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs // *Elife*. 2013. V. 2. e00291–e00291.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00291>
21. *Tabeta K., Georgel P., Janssen E. et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection // *PNAS USA*. 2004. V. 101. P. 3516–3521.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0400525101>
22. *Beutler B., Jiang Z., Georgel P. et al.* Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. V. 24. P. 353–389.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090552>
23. *Jiang Z., Georgel P., Li C. et al.* Details of toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis // *PNAS USA*. 2006. V. 103. P. 10961–10966.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603804103>
24. *Aitman T.J., Glazier A.M., Wallace C.A. et al.* Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 76–83.
<https://doi.org/10.1038/5013>
25. *Jiang Z., Georgel P., Du X. et al.* CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. P. 565–570.
<https://doi.org/10.1038/ni1207>
26. *Rutschmann S., Hoebe K., Zalevsky J. et al.* PanR1, a dominant negative missense allele of the gene encoding TNF- α (tnf), does not impair lymphoid development //

- J. Immunol. 2006. V. 176. P. 7525–7532.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7525>
27. Sun L., Jiang Z., Acosta-Rodriguez V.A. et al. HCFC2 is needed for IRF1- and IRF2-dependent Tlr3 transcription and for survival during viral infections // J. Exp. Med. 2017. V. 214. P. 3263–3277.
<https://doi.org/10.1084/jem.20161630>
28. Nelms K.A., Goodnow C.C. Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators // Immunity. 2001. V. 15. P. 409–418.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00199-6)
29. Papathanasiou P., Goodnow C.C. Connecting mammalian genome with phenome by ENU mouse mutagenesis: gene combinations specifying the immune system // Annu. Rev. Genet. 2005. V. 39. P. 241–262.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095817>
30. Papathanasiou P., Perkins A.C., Cobb B.S. et al. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor // Immunity. 2003. V. 19. P. 131–144.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00168-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00168-7)
31. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 162–174.
<https://doi.org/10.1038/nri747>
32. Siggs O.M., Miosge L.A., Daley S.R. et al. Quantitative reduction of the TCR adapter protein SLP-76 unbalances immunity and immune regulation // J. Immunol. 2015. V. 194. P. 2587–2595.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400326>
33. Miosge L.A., Blasioli J., Blery M., Goodnow C.C. Analysis of an ethylnitrosourea-generated mouse mutation defines a cell intrinsic role of nuclear factor kappaB2 in regulating circulating B cell numbers // J. Exp. Med. 2002. V. 196. P. 1113–1119.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020959>
34. Vinuesa C.G., Cook M.C., Angelucci C. et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity // Nature. 2005. V. 435. P. 452–458.
<https://doi.org/10.1038/nature03555>
35. Soewarto D., Fella C., Teubner A. et al. The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen // Mamm. Genome. 2000. V. 11. P. 507–510.
<https://doi.org/10.1007/s003350010097>
36. Yu P., Constien R., Dear N., Katan M. et al. Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase Cγ2 that specifically increases external Ca²⁺ entry // Immunity. 2005. V. 22. P. 451–465.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.018>
37. Everett K.L., Bunney T.D., Yoon Y. et al. Characterization of phospholipase C gamma enzymes with gain-of-function mutations // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 23083–23093.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019265>
38. Abe K., Fuchs H., Boersma A. et al. A novel N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation in phospholipase Cγ2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and male infertility in vitro in a murine model // Arthritis Rheum. 2011. V. 63. P. 1301–1311.
<https://doi.org/10.1002/art.30280>
39. Abe K., Fuchs H., Lisse T. et al. New ENU-induced semidominant mutation, Ali18, causes inflammatory arthritis, dermatitis, and osteoporosis in the mouse // Mamm. Genome. 2006. V. 17. P. 915–926.
<https://doi.org/10.1007/s00335-006-0014-x>
40. Abe K., Cox A., Takamatsu N. et al. Gain-of-function mutations in a member of the Src family kinases cause autoinflammatory bone disease in mice and humans // PNAS USA. 2019. V. 116. P. 11872–11877.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1819825116>
41. Grosse J., Chitu V., Marquardt A. et al. Mutation of mouse Mayp/Pstpip2 causes a macrophage autoinflammatory disease // Blood. 2006. V. 107. P. 3350–3358.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3556>
42. Chitu V., Pixley F.J., Macaluso F. et al. The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. P. 2947–2959.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0914>
43. Geister K.A., Timms A.E., Beier D.R. Optimizing genomic methods for mapping and identification of candidate variants in ENU mutagenesis screens using inbred mice, G3 // Bethesda. 2018. V. 8. P. 401–409.
<https://doi.org/10.1534/g3.117.300292>
44. Simon M.M., Moresco E.M.Y., Bull K.R. et al. Current strategies for mutation detection in phenotype-driven screens utilising next generation sequencing // Mamm. Genome. 2015. V. 26. P. 486–500.
<https://doi.org/10.1007/s00335-015-9603-x>
45. Астраханцева И., Василенко Е., Бабаев А. и др. Поиск генов, связанных с развитием септического шока, методами прямой генетики // Рос. иммунол. журн. 2018. Т. 12. С. 55–61.
46. Астраханцева И., Гладкова Л., Василенко Е. и др. Новая линия мутантных мышей с избирательной устойчивостью к одному из двух протоколов септического шока // Рос. иммунол. журн. 2020. Т. 23. С. 27–34.
47. Borisova E.V., Epifanova E.A., Tutukova S.A. et al. Identification of novel mutations controlling cerebral cortex malformations caused by ENU-induced mutagenesis in the mouse // Sovrem. Tehnol. v Med. 2018. V. 10. P. 70–77.

Genome-Wide Mutagenesis in Mice: In Search for Genes Regulating Immune Responses and Inflammation

I. V. Astrakhantseva^{a, b, *}, A. N. Tomilin^c, V. S. Tarabykin^{d, e}, and S. A. Nedospasov^{a, f, g, **}

^a*Sirius University of Science and Technology "Sirius", Sochi, 354349 Russia*

^b*Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

^c*Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, 194064 Russia*

^d*Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

^e*Institute of Cell and Neurobiology, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, 10117 Germany*

^f*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

^g*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: astrakhantsevairina@gmail.com*

^{**}*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com*

Genome-wide mutagenesis induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) results in efficient introduction of mutations into genome of mammalian spermatogonial cells. This feature is being used to generate animals with phenotypes associated with defects in various functional systems. In particular, using this methodology, it was possible to identify molecular mechanisms of immune responses, identify genes that regulate the development of various organs, etc. This mini-review covers genetic studies of immunological and inflammatory reactions in mice using ENU mutagenesis, which led to important findings concerning the regulation of critical signaling pathways of innate and adaptive immunity.

Keywords: N-ethyl-N-nitrosourea, genome-wide mutagenesis, forward genetics, signaling, immunogenetics.