

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 9, 2022

Молекулярные механизмы нейропротекторного эффекта метиленового синего (обзор) <i>А.П. Гуреев, И.С. Садовникова, В.Н. Попов</i>	1163
Бактерия <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : системы репарации ДНК и их роль в патогенезе (обзор) <i>В.Ю. Савицкая, М.В. Монахова, Ю.В. Якушкина, И.И. Боровикова, Е.А. Кубарева</i>	1182
Роль стресса эндоплазматического ретикулума в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения (обзор) <i>Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, Г.Е. Онищенко, Е.А. Смирнова</i>	1203
Делеционные варианты ауотранспортера <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> повышают эффективность экспонирования <sup>10</sup> FN3 на поверхности клеток <i>Escherichia coli</i> <i>Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, Е.А. Крюкова, С.Ш. Ганизов, Е.Ф. Болдырева, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников</i>	1223
Химическая протеомика на основе масс-спектрометрии в задачах поиска лекарственных мишеней (мини-обзор) <i>И.И. Федоров, В.И. Линева, И.А. Тарасова, М.В. Горшков</i>	1232
Рекомбинантная внеклеточная холестериноксидаза из <i>Nocardioides simplex</i> <i>В.В. Фокина, М.В. Карпов, В.В. Коллеров, Е.Ю. Брагин, Д.О. Эпиктетов, А.В. Свиридов, А.В. Казанцев, А.А. Шутов, М.В. Донова</i>	1246
Сигнализация и генная экспрессия в скелетной мышце при диабете 2 типа: текущие результаты и перспективы широкозахватных подходов (обзор) <i>А.В. Воротников, Д.В. Попов, П.А. Махновский</i>	1260
Роль HIF – фактора, индуцируемого гипоксией, в механизмах старения (обзор) <i>Д.Ш. Джалилова, О.В. Макарова</i>	1277
Сегрегация кластеров α- и β-глобиновых генов в ходе эволюции позвоночных – случайность или закономерность? (обзор) <i>О.В. Яровая, С.В. Ульянов, Е.С. Юдинкова, С.В. Разин</i>	1301
Дисфункция генов, ассоциируемых с канцерогенезом и апоптозом, развивающаяся в гипоталамусе самцов мышей под влиянием хронического социального стресса <i>А.Г. Галямина, Д.А. Смагин, И.Л. Коваленко, О.Е. Редина, В.Н. Бабенко, Н.Н. Кудрявцева</i>	1318
Анализ активности стероидогенного регуляторного белка острой фазы (STARD1) человека в клетках <i>Escherichia coli</i> <i>С.В. Замалутдинова, Л.В. Исаева, А.В. Замалутдинов, Я.В. Фалетров, М.А. Рубцов, Л.А. Новикова</i>	1334

# CONTENTS

---

---

Vol. 87, Issue 9, 2022

---

---

Molecular Mechanisms of the Neuroprotective Effect of Methylene Blue (Review) <i>A. P. Gureev, I. S. Sadovnikova, and V. N. Popov</i>	1163
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> : DNA Repair Systems and Their Role in Pathogenesis (Review) <i>V. Yu. Savitskaya, M. V. Monakhova, Iu. V. Iakushkina, I. I. Borovikova, and E. A. Kubareva</i>	1182
Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Differentiation of Mesenchymal Cells (Review) <i>E. P. Turishcheva, M. S. Vildanova, G. E. Onishchenko, and E. A. Smirnova</i>	1203
Deletion Variants of Autotransporter from <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> Increase the Efficiency of <sup>10</sup> FN3 Exposure on the Surface of <i>Escherichia coli</i> Cells <i>L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, E. A. Kryukova, S. S. Gapizov, E. F. Boldyreva, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov</i>	1223
Mass Spectrometry-Based Chemical Proteomics for Drug Target Discoveries (Mini-Review) <i>I. I. Fedorov, V. I. Lineva, I. A. Tarasova, and M. V. Gorshkov</i>	1232
Recombinant Extracellular Cholesterol Oxidase from <i>Nocardioides simplex</i> <i>V. V. Fokina, M. V. Karpov, V. V. Kollerov, E. Y. Bragin, D. O. Epiktetov, A. V. Sviridov, A. V. Kazantsev, A. A. Shutov, and M. V. Donova</i>	1246
Signaling and Gene Expression in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes: Current Results and Omics Perspectives (Review) <i>A. V. Vorotnikov, D. V. Popov, and P. A. Makhnovskii</i>	1260
The Role of Hypoxia-Inducible Factor in the Mechanisms of Aging (Review) <i>D. Sh. Dzhililova and O. V. Makarova</i>	1277
Segregation of $\alpha$ - and $\beta$ -Globin Gene Clusters in Vertebrate Evolution: Chance or Necessity? (Review) <i>O. V. Iarovaia, S. V. Ulianov, E. S. Ioudinkova, and S. V. Razin</i>	1301
Dysfunction of the Genes Associated with Carcinogenesis and Apoptosis, Developing in the Hypothalamus Under Chronic Social Defeat Stress in Male Mice <i>A. G. Galyamina, D. A. Smagin, I. L. Kovalenko, O. E. Redina, V. N. Babenko, N. N. Kudryavtseva</i>	1318
Analysis of the Activity of the Human Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STARD1) Expressed in <i>Escherichia coli</i> <i>S. V. Zamalutdinova, L. V. Isaeva, A. V. Zamalutdinov, Y. V. Faletrov, M. A. Rubtsov, and L. A. Novikova</i>	1334

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

### Обзор

© 2022 А.П. Гуреев<sup>1,2\*</sup>, И.С. Садовникова<sup>1</sup>, В.Н. Попов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет,  
394018 Воронеж, Россия; электронная почта: gureev@bio.vsu.ru

<sup>2</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, 394036 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 03.05.2022

После доработки 07.07.2022

Принята к публикации 15.07.2022

Метиленовый синий (МС) является первым полностью синтетическим веществом, которое нашло своё применение в медицине более 120 лет назад для лечения малярии. Сейчас МС одобрен для лечения метгемоглобинемии, но есть предпосылки для его репозиционирования в сторону нейропротекции. Перспективность данного соединения подтверждается тем, что на различных моделях была показана эффективность при терапии болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, моделях черепно-мозговых травм, бокового амиотического склероза, депрессивных расстройствах и т.д. Но задача данного обзора – не столько сконцентрироваться на описании терапевтических эффектов МС при лечении всевозможных нейродегенераций, сколько углубиться в механизмы действия сигнальных путей, на которые данный препарат оказывает прямое или косвенное влияние. МС может функционировать как альтернативный переносчик электронов в дыхательной цепи митохондрий при нарушении работы цепи переноса электронов. Он может оказывать противовоспалительный и антиапоптотический эффекты, ингибировать моноаминоксидазы и NO-синтазы, активировать сигнальные пути, которые обеспечивают обновление митохондриального пула – митохондриальный биогенез и аутофагию, препятствовать агрегации белков с неправильной укладкой. Понимание и комплексное изучение всех аспектов прямого и косвенного действия МС, а не только какого-либо одного эффекта может помочь в его дальнейшем исследовании, в том числе и на клиническом уровне.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** метиленовый синий, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера, тау-белок, альтернативный транспорт электронов, Nrf2/ARE сигнальный путь, апоптоз, аутофагия, воспаление, моноаминоксидаза, NO-синтаза.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090019, **EDN:** AZNPIL

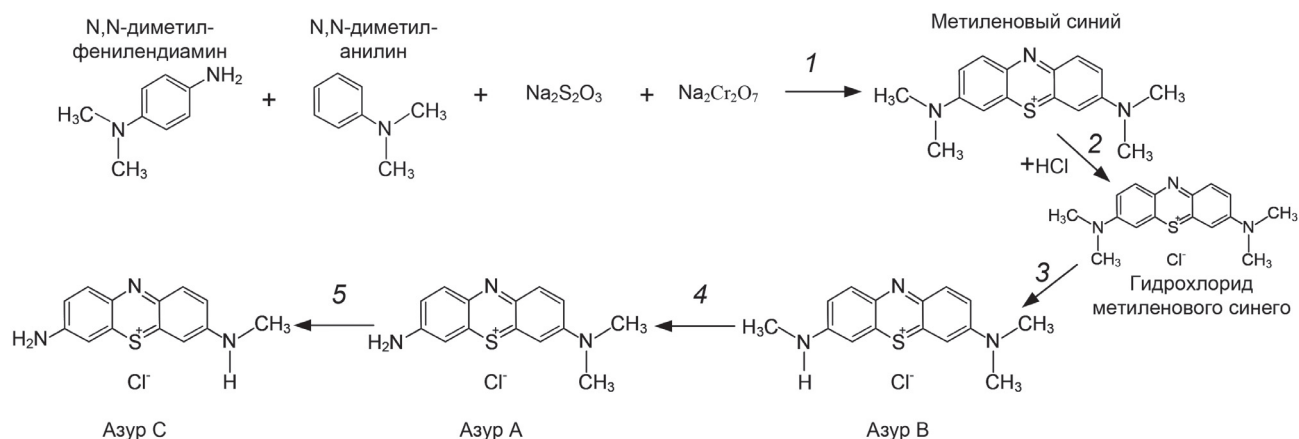
### ВВЕДЕНИЕ

Метиленовый синий (МС; 3,7-бисдиметил-аминофенотиазин хлорид) представляет собой темно-зелёные кристаллы или кристаллический порошок с бронзовым блеском, в воде образует темно-синий раствор, который обычно используется в качестве красителя. Он хоро-

шо растворим в воде и хлороформе, умеренно растворим в спирте. Максимумы поглощения МС составляют 609 и 668 нм, молекулярная масса — 319,852 г/моль [1]. МС не является природным веществом и впервые был синтезирован в 1876 г. химиком Генрихом Каро. Год спустя МС стал первым красителем, запатентованным в Германии [2]. В настоящее время

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БАС – боковой амиотрофический склероз; МАО – моноаминоксидаза; МС – метиленовый синий; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа; ARE – антиоксидант-респонсивный элемент; cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; CRH – кортикотропин-релизинг-гормон; GSK3 $\beta$  – киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$ ; НТТ – хантингтин; Keap1 – kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1; mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих, комплекс 1; NF- $\kappa$ B – ядерный фактор каппа-В; NOS – NO-синтаза; Nrf2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2; PGC-1 $\alpha$  – гамма-коактиватор 1-альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PMCA – Ca<sup>2+</sup>-АТРаза плазматической мембраны; sGC – растворимая гуанилатциклаза; SOD1 – супероксиддисмутаза 1; STAT – преобразователь сигнала и активатор транскрипции; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа.

\* Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Синтез и метаболизм МС. 1 – синтез МС. 2 – гидрохлорирование МС. 3–5 – деметилирование МС и последовательное формирование азуров А, В и С

МС синтезируют окислением N,N-диметилфенилендиамина дихроматом натрия (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) в присутствии тиосульфата натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и дальнейшим окислением в присутствии N,N-диметиланилина [3] (рис. 1, реакция 1). Гидрохлорид МС получают за счёт добавления к раствору красителя 30%-ной соляной кислоты и насыщенного раствора хлорида натрия; после фильтрации продукт промывают 2%-ным раствором хлорида натрия (рис. 1, реакция 2). Резонансные структуры МС обычно изображают с формальным зарядом, расположенным на атоме серы (рис. 1) или на одном из атомов азота (не показано) [4]. Кроме того, МС может быть представлен в виде трёх наиболее распространённых N-деметилованных аналогов: азур А, азур В и азур С [5] (рис. 1, реакции 3–5).

Раствор МС имеет синий цвет в окислительной среде, но превращается в лейко-МС (бесцветную форму) при воздействии восстановителя [3]. Есть много применений МС в аналитической химии или в быту, но в большей степени этот краситель прославился как первый полностью синтетический препарат, применяемый в медицине [6].

Наиболее ранние упоминания о влиянии МС на психологическое состояние человека относятся к концу XIX века. Тогда были получены данные об обезболивающих эффектах МС [7] и его седативном эффекте при различных формах психозов [8]. МС, а точнее его фенотиазиновое ядро, стал основой для синтеза ряда нейролептических препаратов в 1950-х гг., в том числе хлорпромазина и флуфеназина, которые являются незаменимыми препаратами для лечения психотических расстройств. Некоторые исследователи считают, что появление фенотиазинов является началом такого раздела в пси-

хиатрии, как биологическая психиатрия [9]. В это же время МС продолжал использоваться в медицине, но только в качестве красителя для других нейролептиков, что помогало контролировать приём лекарств у пациентов психиатрических клиник за счёт окрашивания мочи в синий цвет [6]. Единичные исследования проводились во второй половине 1930-х гг. Было показано, что МС приносит пользу пациентам, страдающим кататонической деменцией [10] и снижает смертность при эпилептических приступах [11].

Интерес к МС как к нейролептику возродился в 70–80-х гг. XX века, когда появились данные, что повышенный уровень ванадия может иметь этиологическое значение при маниакально-депрессивном расстройстве [12]. Было показано, что МС катализирует восстановление ванадата до ванадила, что значительно подавляло депрессивное поведение [13]. Ещё раньше появились первые данные, демонстрирующие, что МС оказывает влияние на процессы запоминания и сохранения памяти у крыс [14]. В середине 90-х гг. было показано, что МС ингибирует агрегацию тау-белков, а, следовательно, может иметь клиническое применение для лечения болезни Альцгеймера [15].

Позже на основе МС было разработано несколько поколений препаратов, с которыми были проведены клинические исследования, но полученные результаты оказались весьма противоречивыми. Во II-й фазе клинических испытаний был показан положительный эффект препарата на основе МС у пациентов с лёгкой и средней степенью тяжести болезни Альцгеймера (NCT005153330) [16]. Но на этапе фазы III клинических исследований у экспериментальной группы, получавшей таблетки, содержащие 75 и 125 мг МС, не было выявля-



но улучшений по сравнению с группой плацебо (NCT01689246) [17]. Примечательно, что группа плацебо получала тот же препарат, но в концентрации 4 мг, чтобы цвет мочи у группы плацебо не отличался от цвета мочи пациентов из экспериментальной группы. Позже было показано, что даже в концентрации 4 мг/день МС оказывает тот же эффект, что и в высоких концентрациях. Поэтому некоторые исследователи причиной неудачи фазы III клинических испытаний называют некорректный дизайн исследования [18]. В связи с этим в 2018 г. было запущено ещё одно клиническое испытание, где препарат будет использоваться в концентрации 16 и 8 мг/день, а в качестве плацебо будут использованы другие препараты для придания моче характерного цвета. Полное окончание клинических испытаний ожидается в июне 2023 г. (NCT03446001).

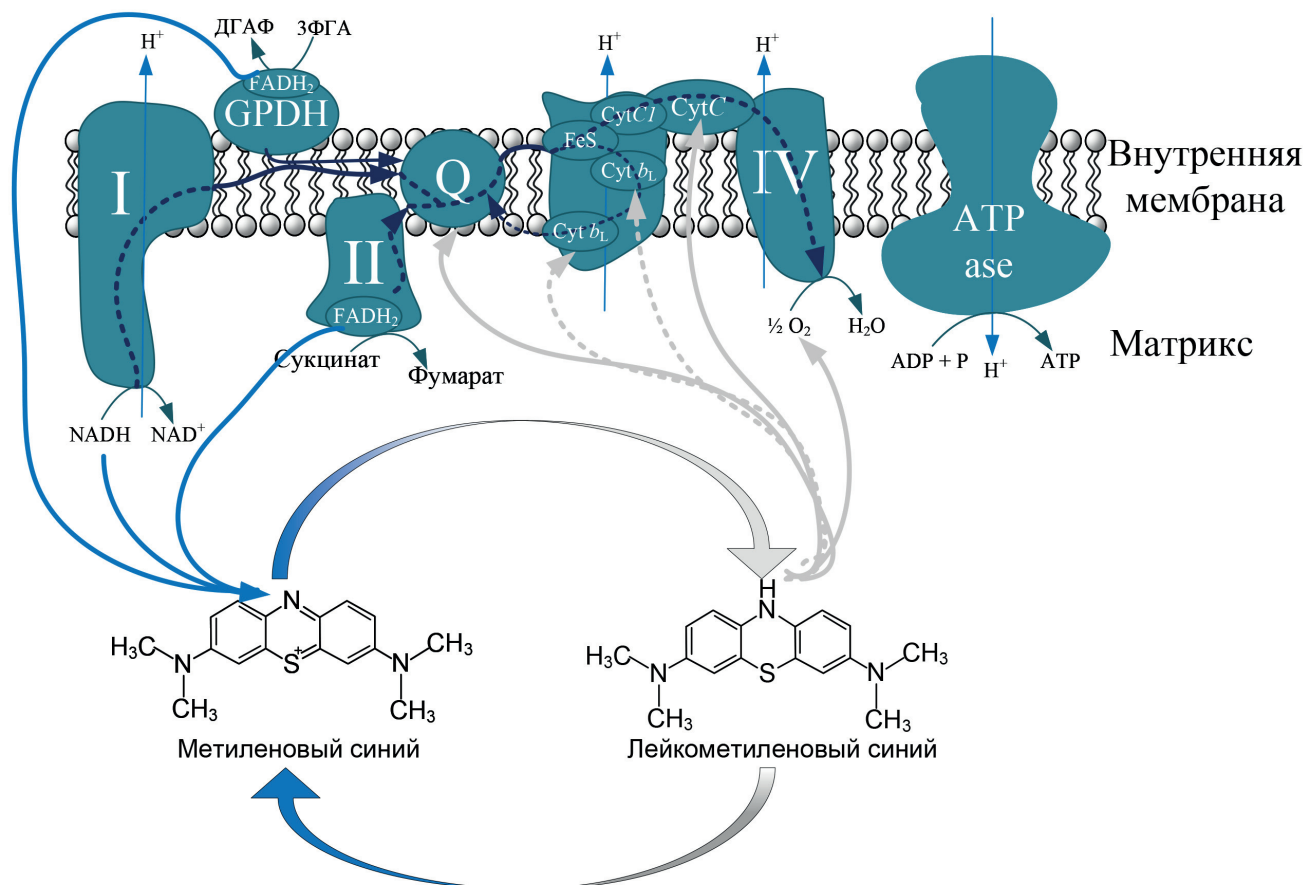
В последнее десятилетие проведено много исследований терапевтического эффекта МС при болезни Хантингтона [19, 20], болезни Паркинсона [21, 22], черепно-мозговых травмах [23–25], ишемических повреждениях головного мозга [26, 27], травмах спинного мозга [28], боковом амиотрофическом склерозе [29] и т.д. Высока вероятность, что в скором времени начнутся клинические испытания МС для лечения других нейродегенеративных и психических заболеваний. Цель данного обзора – не столько суммировать данные о нейропротекторных эффектах МС, сколько проанализировать основные метаболические и сигнальные пути, на которые оказывает влияние МС. Особое внимание уделяется способности МС осуществлять альтернативный транспорт электронов в митохондриях, активировать аутофагию и сигнальный путь Nrf2/ARE, ингибировать моноаминоксидазы (MAO) и NO-синтазы (NOS), препятствовать апоптозу, воспалительным процессам и агрегации неправильно свёрнутых белков.

### **МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПЕРЕНОСЧИК ЭЛЕКТРОНОВ**

Этиология большинства нейродегенеративных заболеваний зачастую комплексная. Наиболее распространёнными факторами, которые способствуют нейродегенерации, являются митохондриальные дефекты и окислительный стресс. Митохондриальные дефекты приводят к увеличению скорости образования активных форм кислорода (АФК), а окислительный стресс, в свою очередь, являет-

ся основной причиной митохондриальных дефектов [30]. Митохондрии имеют несколько сайтов, которые ответственны за продукцию АФК, и большинство из них расположены на внутренней митохондриальной мембране. Комплекс I является основным местом продукции митохондриальных АФК. Кроме того, ингибирование комплекса I приводит к дефициту АТФ и гипертрофии многих  $\text{NAD}^+$ -зависимых ферментов [31]. Митохондрии растений в процессе эволюции приобрели альтернативные пути дыхания, которые включают ротенон-нечувствительные  $\text{NAD(P)H}$ -дегидрогеназы и альтернативную оксидазу. Они позволяют за счёт рассеивания мембранного потенциала снизить продукцию АФК и предотвратить перевосстановление компонентов катаболических путей [32]. У митохондрий животных тоже есть механизм рассеивания мембранного потенциала – мягкое разобщение, которое осуществляется белками-разобщителями (uncoupling proteins – UCPs), вызывающими утечку протонов, снижение мембранного потенциала и сокращение уровня продукции АФК [33]. Имеется целый ряд фармацевтических разобщителей, среди которых наибольший интерес представляет 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ), действующий как протонофор. Вначале 2,4-ДНФ широко использовался в качестве метаболического препарата для снижения веса. В дальнейшем была показана его значительная острая токсичность, и 2,4-ДНФ был запрещён для использования в некоторых странах [34]. Но не только протонофоры могут вызывать рассеивание мембранного потенциала. Альтернативный транспорт электронов с помощью МС является ещё одним способом модуляции митохондриального метаболизма, который, помимо снижения мембранного потенциала, позволяет обходить нарушенные или заингибированные дыхательные комплексы [35]. МС одобрен управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), поэтому повторение истории с неожиданным обнаружением токсичности 2,4-ДНФ крайне маловероятно.

Первые сведения о том, что МС может увеличивать скорость дыхания, были получены в конце 1920-х – начале 1930-х гг. Исследования проводились на безъядерных эритроцитах птиц и млекопитающих [36], неоплодотворённых яйцах морских звёзд [37], в которых изучались окислительно-восстановительные свойства МС. В 1938 г. Elliott и Greig [38] обнаружили, что сукцинат может окисляться до фумарата в присутствии МС, который «принимает атомы водорода и восстанавливается до



**Рис. 2.** Функционирование МС в качестве альтернативного переносчика электронов. МС может принимать электроны от NADH и FADH<sub>2</sub>, которые в норме окисляются в I- и II-комплексах ЭТЦ, а также α-глицерофосфатдегидрогеназы (GPDH), которая катализирует реакцию превращения глицеральдегид-3-фосфата (3-ФГА) в дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ). При этом сам МС восстанавливается до бесцветной лейкоформы. Лейко-МС может отдавать электроны на убихинон, комплекс III, цитохром *c* (Cyt *c*), а также на молекулярный кислород

лейко-МС». Тогда как в обычных условиях, без МС, акцептором протонов являлся окисленный цитохром. В 1949 г. Slater [39] изучал сукцинатдегидрогеназный комплекс в сердечной мышце и в почках и показал, что цитохром *b* участвует в катализе восстановления МС сукцинатом (рис. 2). Далее было обнаружено, что убихинон и его гомологи могут опосредовать реакцию между электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) и МС [40], а также тот факт, что МС может окислять NADPH [41].

Исследования МС на изолированных митохондриях начались ближе к началу XXI века. Было показано, что МС может стимулировать митохондриальное дыхание, которое было ингибировано хлорацетальдегидом, модулирующим митохондриальный окислительный метаболизм длинноцепочечных жирных кислот в печени. В то же время МС стимулировал преимущественно дыхание в состоянии 4 по Чансу (нефосфорилирующее дыхание), а не в состоянии 3 по Чансу (фосфорилирующее дыхание), что позволяет характеризовать МС как разоб-

щитель фосфорилированного дыхания [42, 43]. Последующие работы показали, что МС увеличивает активность цитохром *c*-оксидазы [44]. Это подтвердило предположение о том, что МС функционирует как альтернативный переносчик электронов (рис. 2). Донором электронов для МС является NADH, а цитохром *c* — акцептором [35]. Позже было показано, что МС увеличивает скорость дыхания, если в качестве субстрата для дыхания используется сукцинат и α-глицерофосфат. Таким образом, сукцинатдегидрогеназа и α-глицерофосфатдегидрогеназа (GPDH) также способны участвовать в передаче электронов на МС [45] (рис. 2). При этом МС может переносить электроны не только на цитохром *c*, но и непосредственно на O<sub>2</sub>, что проявлялось в МС-зависимом увеличении скорости продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, которое было неоднократно продемонстрировано [43, 45–47] (рис. 2). Таким образом, механически МС является прооксидантом, который может увеличивать скорость продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что было показано как при добавлении МС

к изолированным митохондриям [45, 48], так и при терапии МС *in vivo* [46]. Но при этом в концентрациях до 100 мкМ не было показано генотоксичного эффекта МС в отношении митохондриального генома [48]. В 2015 г. в работе Atamna et al. [49] окислительный стресс, индуцированный МС, характеризуется термином «мягкий окислительный стресс», который не оказывает деструктивного эффекта на клеточные компоненты, но может запускать некоторые сигнальные механизмы (в том числе и опосредующие антиоксидантный эффект МС), которые обсуждаются в последующих разделах.

Альтернативный транспорт электронов позволяет обходить ингибированный комплекс I. Было показано, что МС шунтирует блок, который создавался ротеноном [45, 47, 50, 51] и диметакрилат триэтиленгликолем (Triethylene glycol dimethacrylate – TEGDMA) [52]. Однако открытым остаётся вопрос о возможности обхода комплекса III. Tretter et al. [45] и Sváb et al. [53] показали, что МС увеличивал скорость дыхания и восстанавливал мембранный потенциал при ингибировании антимицином и миксотиазолом, что согласуется с данными, свидетельствующими о повышении активности цитохром *c*-оксидазы. В 2019 г. Gureev et al. [47], напротив, показали, что МС не восстанавливает дыхание и мембранный потенциал, ингибированные антимицином, но при этом восстанавливает дыхание и мембранный потенциал, ингибируемые ротеноном. Это более согласуется с результатами Slater [39], показавшего участие цитохрома *b* в катализе восстановления МС сукцинатом (рис. 2). Причина различий нуждается в дальнейшем разъяснении. Однако эти расхождения в механизме функционирования не носят принципиальный характер, так как нарушения в комплексе I, а не в комплексе III чаще всего приводят к развитию митохондриально-зависимых патологий [54].

### МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Неправильный фолдинг, агрегация и аккумуляция белков в головном мозге зачастую являются причиной запуска патологических процессов, которые приводят к гибели нейронов и развитию нейродегенеративных заболеваний. Накопление белков с неправильной структурой, таких как амилоид- $\beta$  и фосфорилированный тау-белок, связано с развитием болезни Альцгеймера. Неправильно свёрнутые и агрегированные белки вызывают митохондриальную дисфункцию, которая приводит к

повышению уровня АФК и окислительному стрессу, вызывают нейровоспаление за счёт активации микроглии, что приводит к повреждению синапсов и гибели нейронов [55].

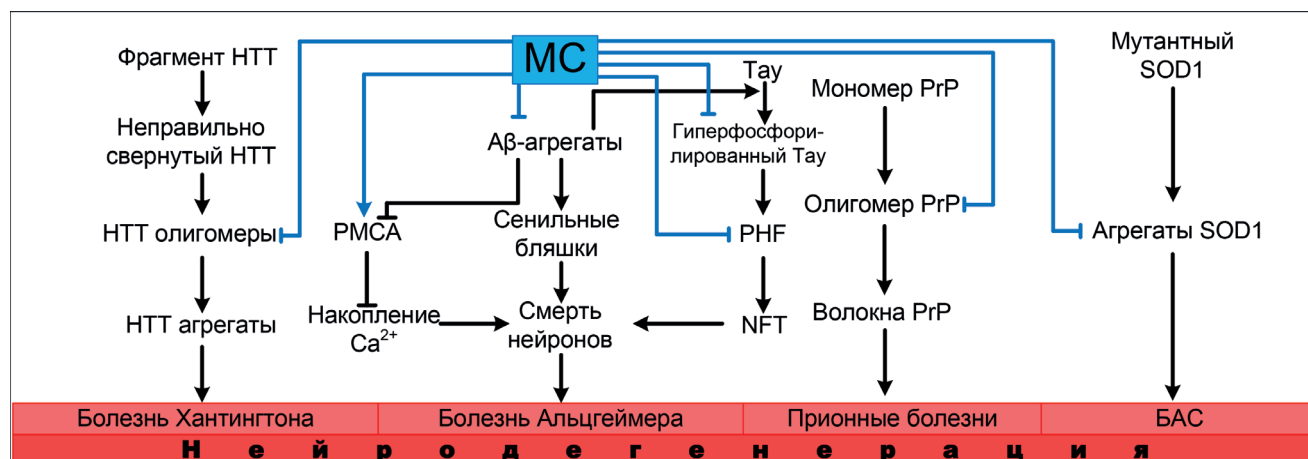
В 1996 г. Wischik et al. [15] впервые показали, что МС в наномолярных концентрациях ингибирует агрегацию тау-белка и нарушает стабильность протеазорезистентных парных спиральных филаментов (paired helical filaments – PHF) (рис. 3). Ингибирование образования тау-филаментов с помощью МС было впоследствии подтверждено Taniguchi et al. [56] – в 2005 г., и Hattori et al. [57] – в 2008 г. Диета с добавлением МС приводила к значительному снижению уровня фосфорилированного тау-белка у мышей линии P301S [58] и линии Тау $\Delta$ K [59]. МС ингибировал олигомеризацию мономеров амилоида- $\beta$  [60]. Также фотовозбуждённые молекулы МС блокировали агрегацию амилоида- $\beta$  за счёт его окисления синглетным кислородом, образующимся в ходе фотохимической реакции [61]. МС активировал  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу плазматической мембраны (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase – PMCA), играющую важную роль в поддержании гомеостаза цитозольного кальция в концентрации, которая необходима для нормального функционирования нейронов. МС препятствует инактивации PMCA, вызванной накоплением амилоида- $\beta$  и тау [62, 63].

Неправильный фолдинг белков играет ключевую роль в патогенезе болезни Хантингтона (рис. 3). Мутантная форма белка хантинтина (НТТ) склонна к расщеплению, неправильному фолдингу и агрегации. Накопление агрегатов в конечном итоге приводит к дисфункции нейронов [64]. МС ингибировал агрегацию нерастворимого мутантного белка НТТ *in vitro* и снижал нейротоксичность [19]. Дальнейшие исследования показали, что МС защищает сердце *Drosophila melanogaster* от НТТ-индуцированной токсичности, но не оказывает эффекта в нейронах из-за плохого прохождения через гематоэнцефалический барьер *D. melanogaster* [20].

Имеются данные, показывающие, что МС является потенциально эффективным препаратом для лечения прионных болезней – семейство редких, но фатальных патологий, поражающих людей и различные виды животных. Было продемонстрировано, что МС влияет на кинетику олигомеризации неправильно свёрнутого прионного белка (PrP) и уменьшает количество олигомера примерно на 30% [65] (рис. 3).

Ряд исследований выявили связь между патогенезом бокового амиотрофического скле-





**Рис. 3.** МС ингибирует олигомеризацию и последующее агрегирование расщеплённого мутантного белка НТТ, что может замедлять патогенез болезни Хантингтона. МС препятствует накоплению амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ), гиперфосфорилированию тау-белка и, следовательно, образованию нейрофибрилярных клубков (NFT), способствует активации РМСА, что в сумме позволяет замедлить патогенез болезни Альцгеймера. МС препятствует олигомеризации неправильно свернутого прионного белка (PrP) и неправильно свернутого SOD1, что замедляет течение прионных заболеваний и БАС

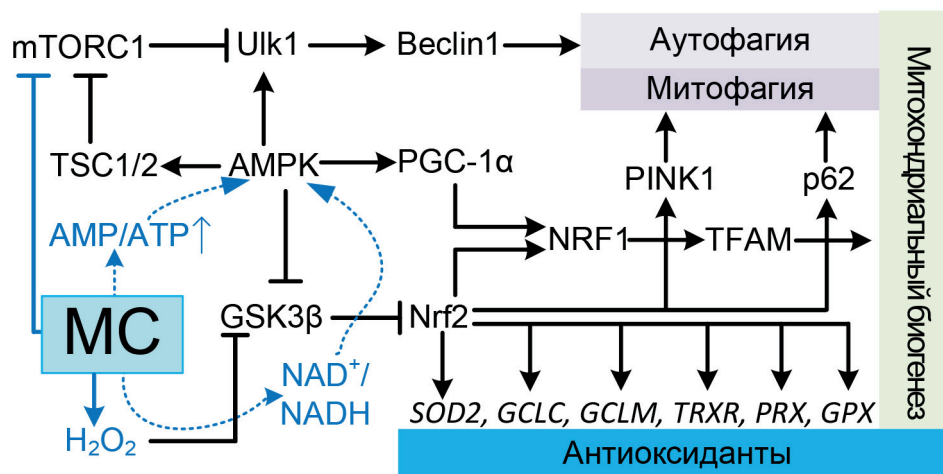
роза (БАС), неправильным фолдингом и агрегацией супероксиддисмутазы 1 (SOD1) [66]. Было показано, что МС модулирует спонтанную амилоидную агрегацию SOD1 в клеточных линиях [67, 68] и животных моделях *Danio rerio* и *Caenorhabditis elegans* [69, 70] (рис. 3).

### МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК АКТИВАТОР СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NRF2/ARE

Сигнальный путь Nrf2/ARE (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element) регулирует экспрессию генов, кодирующих белки с цитопротекторными свойствами, например, антиоксидантные ферменты, белки фазы II детоксикации ксенобиотиков, противовоспалительные белки, а также метаболические ферменты и регуляторы, участвующие в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза [71] (рис. 4). Ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2 (Nrf2), представляет собой короткоживущий белок (время жизни около 15 мин), который при отсутствии активирующих факторов подвергается убиквитинированию и протеосомной деградации. На сегодняшний день хорошо описаны две системы убиквитинлигаз, которые опосредуют деградацию Nrf2: Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap1) и киназа гликогенсинтазы  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) [72]. Индукторы Nrf2 представляют собой факторы, которые способствуют высвобождению Nrf2 от Keap1 или GSK3 $\beta$ , что приводит к транслокации Nrf2 в ядро и связыванию с факторами транскрипции основной лейциновой молнии (bZip) (чаще всего малыми MAF) и коакти-

ватором СВР (CREB-binding protein), который обладает гистон-ацетилтрансферазной активностью, приводящей к изменениям в структуре хроматина. Это обеспечивает релаксацию ARE-содержащего промотора и связывание с РНК-полимеразой. Подобный механизм регулирует экспрессию большинства генов-мишеней Nrf2 [73].

Было показано, что МС увеличивает экспрессию гена *Nfe2l2* (ген, кодирующий Nrf2), генов антиоксидантов: *Ho-1* (кодирующего гем-оксигеназу), *Nqo1* (кодирующего NAD(P)H хинондегидрогеназу 1), *Gclc* и *Gclm* (кодирующих каталитическую и модифицирующую субъединицы гамма-глутамилцистеинсинтазы соответственно), *Trx1* и *Trx2* (кодирующих тиоредоксины 1 и 2), *TrxR1* и *TrxR2* (кодирующих тиоредоксинредуктазы 1 и 2), *Grx1* и *Grx2* (кодирующих глутаредоксины 1 и 2), *Prx6* (кодирующего перкосиредоксин 6) и препятствует нейротоксичности, ассоциированной с тау-белком [45]. МС препятствовал возрастному снижению экспрессии антиоксидантного гена *Sod2* (кодирующего супероксиддисмутазу) [46] (рис. 4). Участие пути Nrf2/ARE в задержке клеточного старения обсуждалось Atamna et al. [49]. Активация Nrf2, индуцированная МС, оказывала терапевтический эффект при колите, индуцированном TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) [74]. До сих пор нет прямых доказательств того, что МС непосредственно окисляет Keap1 или GSK3 $\beta$ . Было высказано предположение, что индуцированная МС продукция  $H_2O_2$  может стимулировать окисление Keap1 или GSK3 $\beta$ , последующую активацию Nrf2 и усиление антиоксидантной защиты [45, 46]. Примечательно,



**Рис. 4.** Влияние МС на сигнальный путь Nrf2/ARE, который регулирует экспрессию генов, кодирующих ключевые антиоксидантные белки, отвечает за координацию процессов митохондриального биогенеза и митофагии. Влияние МС на аутофагию путём ингибирования mTORC1, а также по mTORC1-независимому пути

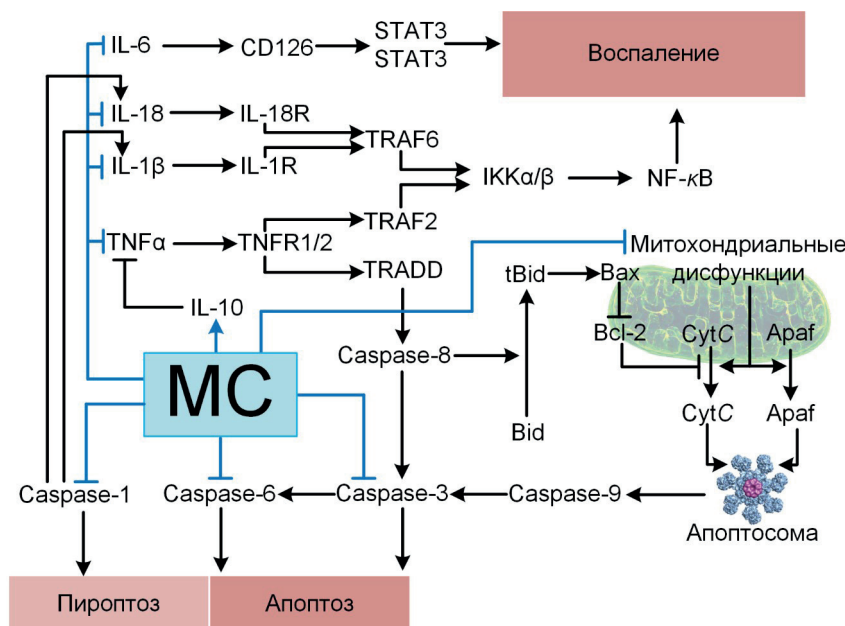
что у *Escherichia coli* МС также способен индуцировать экспрессию генов, защищающих от окислительного стресса путём активации регулона soxRS, что натолкнуло авторов исследования на аналогию с активацией Nrf2/ARE-пути [75].

Другой важной функцией сигнального пути Nrf2/ARE является регуляция митохондриального биогенеза [76]. МС увеличивает количество митохондрий в головном мозге 15-месячных мышей, что проявляется в увеличении числа копий мтДНК, увеличении экспрессии гена *Cox1* (кодируется мтДНК), а также *Nrf1* и *Tfam*, которые принимают непосредственное участие в процессах транскрипции мтДНК [46] (рис. 4). Влияние МС на активацию митохондриального биогенеза было отмечено Atamna et al. [49], однако указывается, что это достигается за счёт активации пути AMPK/PGC-1α (AMP activated protein kinase/ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α), который долгое время считался главным регулятором митохондриального биогенеза [77]. В то же время активация пути Nrf2/ARE не указана как путь активации митохондриального биогенеза [49]. В последние годы обсуждаются перекрёстные связи между путями Nrf2/ARE и AMPK/PGC-1α [76], которые опровергают упрощённое представление о «главном регуляторе митохондриального биогенеза» для пути AMPK/PGC-1α [78]. Не менее интересен и механизм активации AMPK с помощью МС. С одной стороны, МС восстанавливает митохондриальное дыхание и производство АТФ в условиях нарушения функционирования ЭТЦ. По этой причине, по предположению Xie et al. [79], активация AMPK не может происходить за счёт смещения

равновесия AMP/АТФ в сторону AMP. С другой стороны, нами было показано, что альтернативный транспорт электронов вызывает снижение трансмембранной разности потенциала, что, по всей видимости, должно замедлять скорость синтеза АТФ и, следовательно, смещать равновесие AMP/АТФ в сторону AMP [43]. Atamna et al. [49] предположили, что МС за счёт альтернативного транспорта электронов вызывает смещение равновесия NAD<sup>+</sup>/NADH в сторону NAD<sup>+</sup>, что приводит к увеличению уровня фосфорилирования AMPK, и подтвердили это экспериментально.

### МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК АКТИВАТОР АУТОФАГИИ

Аутофагия – это процесс самоуничтожения клеточных компонентов, при котором сначала двухмембранные аутофагосомы изолируют органеллы, затем сливаются с лизосомами для лизиса гидролазами. Аутофагия активируется в ответ на внеклеточные или внутриклеточные стрессовые факторы [80]. Стресс запускает процессы, которые приводят к активации AMPK или p53, что снижает активность комплекса 1 мишени рапамицина млекопитающих (mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1) (рис. 4). Снижение активности mTORC1 приводит к повышению активности комплекса ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase), что впоследствии инициирует образование фагофора совместно с комплексом фосфоинозитид-3-киназы (PI3K; включает белки PI3K-III, Beclin-1, VPS34, p150 и ATG14). Рост и созревание фагофора зависит от двух убиквитин-подобных систем



**Рис. 5.** Влияние МС на апоптоз за счёт ингибирования эффекторных каспаз и устранения митохондриальных дисфункций, которые являются частой причиной выхода цитохрома *c* (Cyt C) и Apaf1 в цитоплазму. Влияние МС на пироптоз и воспалительные процессы за счёт ингибирования каспазы-1, провоспалительных цитокинов и активации противовоспалительного цитокина

конъюгации, ATG12 и ATG8 [81]. Нарушения в регуляции аутофагии наблюдаются при многих неврологических расстройствах человека, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и БАС [82].

Изначально было показано, что терапия МС не влияет на индукцию аутофагии, поскольку не изменялись уровни Beclin-1 (комплекс PI3K), Atg 7 (система ATG12) и LC3-II (система ATG8) у мышей 3xTg-AD [83]. Позже появились данные о том, что МС оказывает влияние на уровень LC3-II. Это позволило предположить, что он является мощным индуктором аутофагии у мышей с таупатией. Было высказано предположение, что МС функционирует как рапамицин и ингибирует mTOR, тем самым вызывая активацию аутофагии [84]. Jiang et al. [85] показали, что МС-индуцированная аутофагия участвует в инактивации p53, которая активирует AMPK. AMPK, в свою очередь, ингибирует mTOR, активируя Tsc2. Однако есть данные, что МС также приводит к аутофагии за счёт активации AMPK, которая фосфорилирует ULK1, а уровень фосфорилирования mTORC1 не изменяется [79]. ULK1 фосфорилирует Beclin-1, который необходим для инициации аутофагии. Уровень Beclin-1 увеличивается при лечении черепно-мозговой травмы с помощью МС [86].

Имеются данные о том, что МС может индуцировать митофагию, частный случай аутофагии [87]. Вероятно, МС-индуцированная митофагия может быть связана с активацией

сигнального пути Nrf2/ARE, так как имеются данные, что белок p62 образует петлю обратной связи с Nrf2 [88]. Кроме того, Nrf2 может регулировать экспрессию гена *PINK1* [89]. И p62, и *PINK1* играют ключевую роль в регуляции митофагии (рис. 4).

## МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК СУПРЕССОР АПОПТОЗА

При оценке влияния МС на апоптоз необходимо чётко разграничить условия, при которых происходит терапия. В условиях фотодинамической терапии МС будет функционировать как фотосенсибилизатор и стимулировать апоптоз [90]. Фотодинамическая терапия является достаточно широко используемым методом лечения различных злокачественных и доброкачественных опухолей. Фотосенсибилизатор поглощает энергию источника света и может передавать её молекулярному кислороду с образованием синглетного кислорода ( $^1O_2$ ).  $^1O_2$  является крайне электрофильной формой кислорода и может окислять биологические макромолекулы, тем самым повреждая их. Фотосенсибилизатор должен быть амфифильным, накапливаться в опухолевой ткани и быстро выводиться из нормальной ткани, а также иметь низкий уровень токсичности в отсутствии освещения [91]. Всем этим требованиям отвечает МС [92]. Но в контексте нейропротекторного эффекта МС нас интересуют его



антиапоптотические свойства, которые будут рассмотрены ниже.

Апоптоз можно разделить на три фазы: внешний путь, внутренний путь и эффекторная фаза. Внешний путь активируется лигандами смерти (TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha), FASL (Fas ligand), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)), которые связываются с соответствующими рецепторами на клеточной поверхности, запуская процесс их агрегации [93] (рис. 5). Эта агрегация задействует адапторные белки в цитоплазматическом участке рецепторов, формируя сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель (DISC, death-inducing signaling complex). DISC стимулирует автокаталитическую активацию каспазы-8 и её высвобождение в цитоплазму, где она активирует каспазный каскад [94].

Внутренний путь апоптоза ассоциирован с митохондриями. Различные митохондриальные дисфункции, например, пермеабилитация наружной мембраны, открытие митохондриальных пор проницаемости, вызывают выход цитохрома *c* и Araf1 (Apoptotic protease activating factor 1) из митохондрий [95] (рис. 5). Эти два компонента олигомеризуются и образуют сложную структуру – апоптосому, которая необходима для расщепления прокаспазы до её активной формы, каспазы-9, которая, в свою очередь, расщепляет и активирует другие прокаспазы в эффекторные каспазы [96]. Внешний и внутренний пути апоптоза связываются друг с другом с помощью белка Bid (BH3 interacting-domain death agonist). Активная каспаза-8 расщепляет белок Bid. Укороченная форма Bid (truncated Bid, tBid) транслоцируется в митохондрии и активирует проапоптотические белки (Bcl-2-associated X protein, Bax) и деактивирует антиапоптотические белки (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), которые влияют на высвобождение цитохрома *c* [97]. Эффекторная фаза апоптоза осуществляется каспазами 3 и 6. Они вызывают деградацию ядерного материала, в том числе ДНК, а также других клеточных компонентов, в частности цитоскелета [98].

Запрограммированная гибель клеток посредством апоптоза служит естественным барьером для развития опухолей. С другой стороны, активация апоптоза играет ключевую роль в прогрессировании неврологических расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, черепно-мозговая травма и БАС, как показано в исследованиях на многих моделях [99]. Терапия с МС может подавлять апоптоз через PI3-K/Akt/GSK-3 $\beta$ -зависимый путь при кровоизлиянии в мозг [100].

У мышей с ишемией головного мозга, которые подвергались терапии МС, уровни p53 и Bax были снижены, а количество белка Bcl-2 было увеличено [85]. МС также снижал уровень Bax и увеличивал экспрессию белка Bcl-2 при колите, вызванном TNBS [74], и индуцированном ротеноном повреждении nigrostriальной системы [101]. МС, по всей видимости, не напрямую взаимодействует с Bcl-2 и Bax, а косвенно. Скорее всего, МС оказывает влияние на уровни про- и антиапоптотических факторов, ингибируя TNF- $\alpha$  [100, 101] или препятствуя возникновению митохондриальных дисфункций. Например, МС предотвращал открытие митохондриальных пор [102].

МС снижал количество цитохрома *c* в цитозоле и активность каспазы-3 [26, 27, 101–104], каспазы-6 [104, 105], каспазы-8 [26, 103], каспазы-9 [27, 102] и каспазы-1, отвечающей за пироптоз [106]. Для каспазы-1, каспазы-3 и каспазы-6 было показано, что МС может непосредственно окислять их каталитические домены и ингибировать их активность [103] (рис. 5). Были получены и противоположные данные, показывающие, что МС уменьшал острое ишемическое повреждение головного мозга, но количество апоптотических клеток не уменьшалось, а даже несколько увеличивалось, однако при этом снижался процент некротических клеток [87].

### МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК СУПРЕССОР ВОСПАЛЕНИЯ

Воспаление представляет собой сложную реакцию организма на различные внешние и внутренние раздражители. Воспаление характеризуется физиологическими процессами (увеличением артериального давления, изменением проницаемости сосудов), клеточными процессами (увеличением количества лейкоцитов) и молекулярными процессами (увеличением уровня провоспалительных медиаторов). Неконтролируемое острое воспаление может стать причиной хронического воспаления, способствуя развитию различных нейродегенеративных заболеваний [107]. Иммунный ответ человека регулируется сложной сетью медиаторов, таких как интерлейкины (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-18, IL-10), TNF- $\alpha$  и др. (рис. 5). Воспалительные стимулы связываются со специфическими рецепторами. Активация рецептора запускает важные внутриклеточные сигнальные пути, такие как ядерный фактор каппа-В (NF- $\kappa$ B), митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK), янус-киназа (JAK), сиг-

нальные белки и активаторы транскрипции из семейства белков STAT (Signal transducer and activator of transcription) [108].

Уровни провоспалительных цитокинов в тканях являются маркерами воспалительных процессов. TNF- $\alpha$  – один из наиболее мультифункциональных и хорошо изученных цитокинов. Его основными источниками являются макрофаги и Т-клетки, но было описано, что многие другие клетки, такие как В-клетки, нейтрофилы и эндотелиальные клетки, также продуцируют TNF- $\alpha$ . Несколько исследований показали, что МС вызывает снижение уровня TNF- $\alpha$  в различных тканях и при различных физиологических состояниях [99, 100] (рис. 5). TNF- $\alpha$  связывается с TNFR1/2 и приводит к TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2)-зависимой активации NF- $\kappa$ B [109]. NF- $\kappa$ B контролирует экспрессию многих генов, участвующих в воспалении, и, по-видимому, NF- $\kappa$ B проявляет хроническую активность при многих воспалительных заболеваниях [110]. МС также снижает уровень NF- $\kappa$ B [101].

IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  являются каноническими активаторами NF- $\kappa$ B. МС значительно снижает экспрессию и уровень белков IL-1 $\alpha$ / $\beta$  [100, 111, 112]. IL-6 также является провоспалительным цитокином. Передача сигнала IL-6 включает активацию JAK, а затем приводит к активации транскрипционного фактора STAT3. STAT3 фосфорилируется и образует димеры с другими членами семейства STAT. Активированный комплекс STAT3 транслоцируется в ядро и регулирует экспрессию широкого спектра генов, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины [113]. Неоднократно было показано, что МС снижает уровень IL-6 [29, 74, 100, 112] и других провоспалительных факторов: IL-12 [29], IL-17 [74, 112] и IL-18 [100, 112] (рис. 5).

Не все интерлейкины являются провоспалительными. Например, IL-10 играет решающую роль в предотвращении воспалительных и аутоиммунных патологий [114]. Имеются данные о том, что IL-10 подавляет работу других провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  [115]. МС повышал уровень IL-10 в тканях в соответствии с его противовоспалительным действием [100, 112] (рис. 5).

### **МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР МОНОАМИНОКСИДАЗЫ**

Моноаминоксидазы (MAO) регулируют синаптические и внутринейрональные кон-

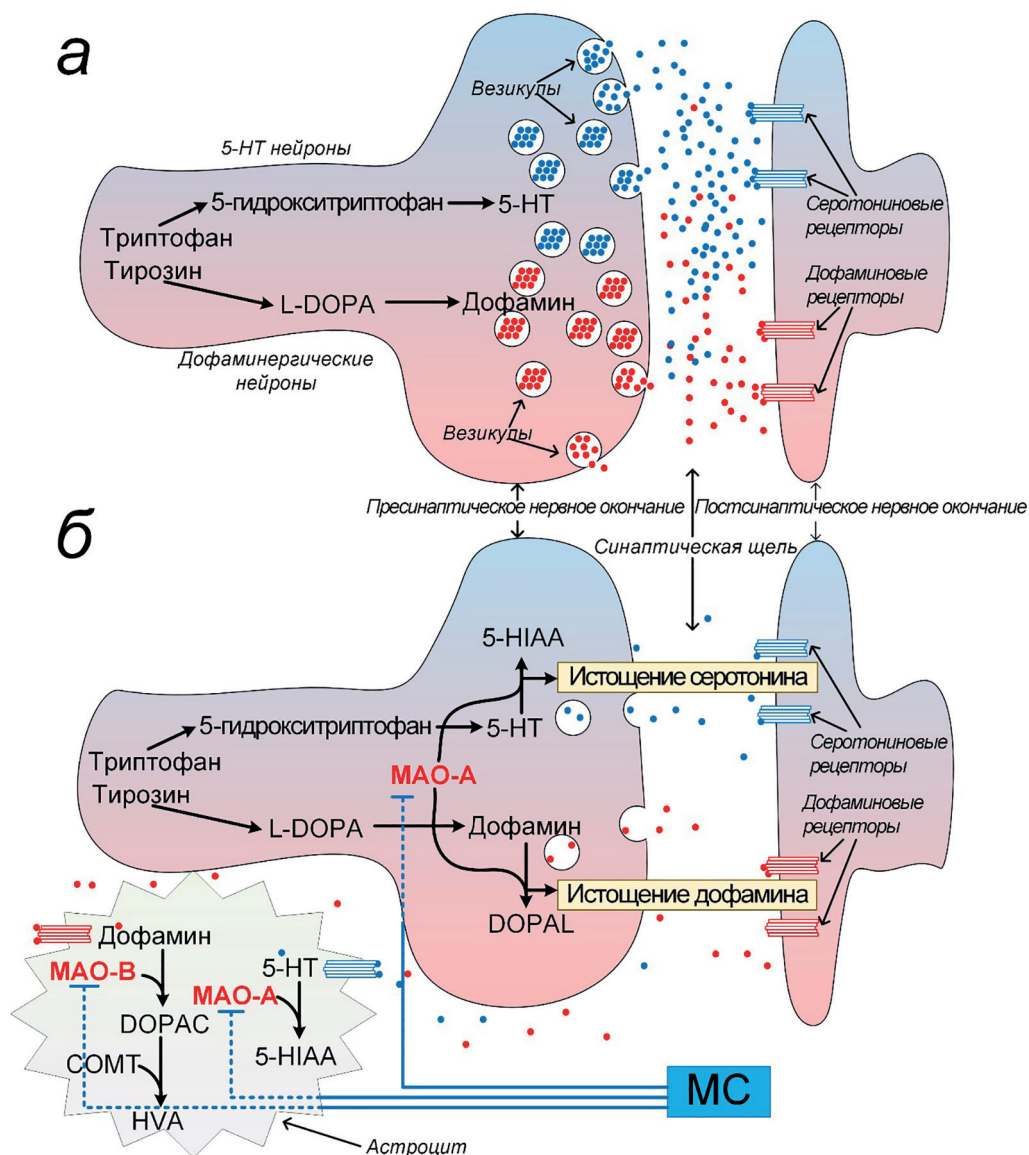
центрации норадреналина, серотонина и дофамина (рис. 6). MAO имеет две изоформы: MAO типа А и MAO типа В. MAO-А в первую очередь отвечает за метаболизм серотонина. Обе изоформы ответственны за метаболизм дофамина [116]. Согласно серотониновой теории депрессии, MAO-А катализирует окислительное дезаминирование серотонина (5-НТ), превращая его в 5-гидрокси-3-индолуксусный альдегид (5-НИАЛ), который в дальнейшем перерабатывается в 5-гидрокси-3-индолуксусную кислоту (5-НИАА) с помощью альдегиддегидрогеназы [117].

Астроциты также участвуют в регуляции метаболизма серотонина за счёт поглощения серотонина транспортёром обратного захвата серотонина (SERT) и последующей деградации с помощью MAO-А [118]. Кроме того, фермент MAO-А опосредует окисление дофамина в 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (DOPAL) наряду с образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в пресинаптических окончаниях. MAO-В метаболизирует дофамин в 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC), а катехол-О-метилтрансфераза (COMT) расщепляет его до гомованилиновой кислоты (HVA) в астроцитах [119]. Антидепрессивный эффект ингибирования MAO заключается в повышении уровня всех биогенных аминов [120].

Первое упоминание о том, что МС ингибирует MAO, было сделано в 1996 г. [121]. МС ингибирует обе изоформы MAO, но MAO-А в несколько раз сильнее, чем MAO-В [122] (рис. 6, б). Позже эффективность МС против депрессии была показана на животных моделях [123]. Стоит отметить, что некоторые производные МС, например азуран В, более эффективны при лечении психотических расстройств [4, 60, 124, 125].

### **МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР NO-СИНТАЗЫ**

Белки семейства NO-синтаз (NOS) являются важными регуляторами психологического состояния человека. Существует несколько форм NOS, выполняющих определённые функции. Нейрональная NOS (nNOS) локализуется в синаптических шипиках, эндотелиальная NOS (eNOS) – в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга и двигательных нейронах, индуцируемая NOS (iNOS) – в астроцитах и микроглии и индуцируется при некоторых патологических состояниях [126]. Воспалительные процессы являются важными факторами активации iNOS в астроцитах и микроглии гип-



**Рис. 6.** Влияние МС на метаболизм серотонина и дофамина. *а* – Синтез и метаболизм серотонина и дофамина в нормальных физиологических условиях. *б* – Метаболизм серотонина и дофамина в условиях активации MAO-A и MAO-B в синапсах и астроцитах. MAO-A способствует окислению дофамина в 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (DOPAL). MAO-B метаболизирует дофамин в 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC), а катехол-О-метилтрансфераза (COMT) расщепляет его до гомованилиновой кислоты (HVA) в астроцитах. МС препятствует истощению серотонина и дофамина за счёт ингибирования MAO-A и MAO-B

покампа [127] (рис. 7). Повышение уровня NO приводит к активации растворимой гуанилатциклазы (sGC)/циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Этот сигнальный путь является ключевой особенностью когнитивного дефицита и депрессии [128]. Сигнальный путь iNOS/NO/sGC/cGMP в пресинаптических окончаниях вызывает высвобождение глутамата, который активирует постсинаптические рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR) для увеличения концентрации Ca<sup>2+</sup> и дальнейшей активации NO, полученного от nNOS [129]. Кроме того, глюкокортикоиды могут активировать nNOS через высокоаффинный минерало-

кортикоидный рецептор (MR). В свою очередь, NO подавляет локальную экспрессию глюкокортикоидных рецепторов (GR) посредством сигнальных путей sGC/cGMP и пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>), регулируемых внеклеточным сигналом киназ (ERK). Это приводит к повышению уровня гипоталамического кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH) [130]. Гипоталамическая секреция CRH стимулирует переднюю долю гипофиза к высвобождению адренокортикотропного гормона (АСТН), который вызывает надпочечниковую секрецию глюкокортикоидов. Повышенный уровень глюкокортикоидов, CRH и АСТН, является фактором депрессивно-



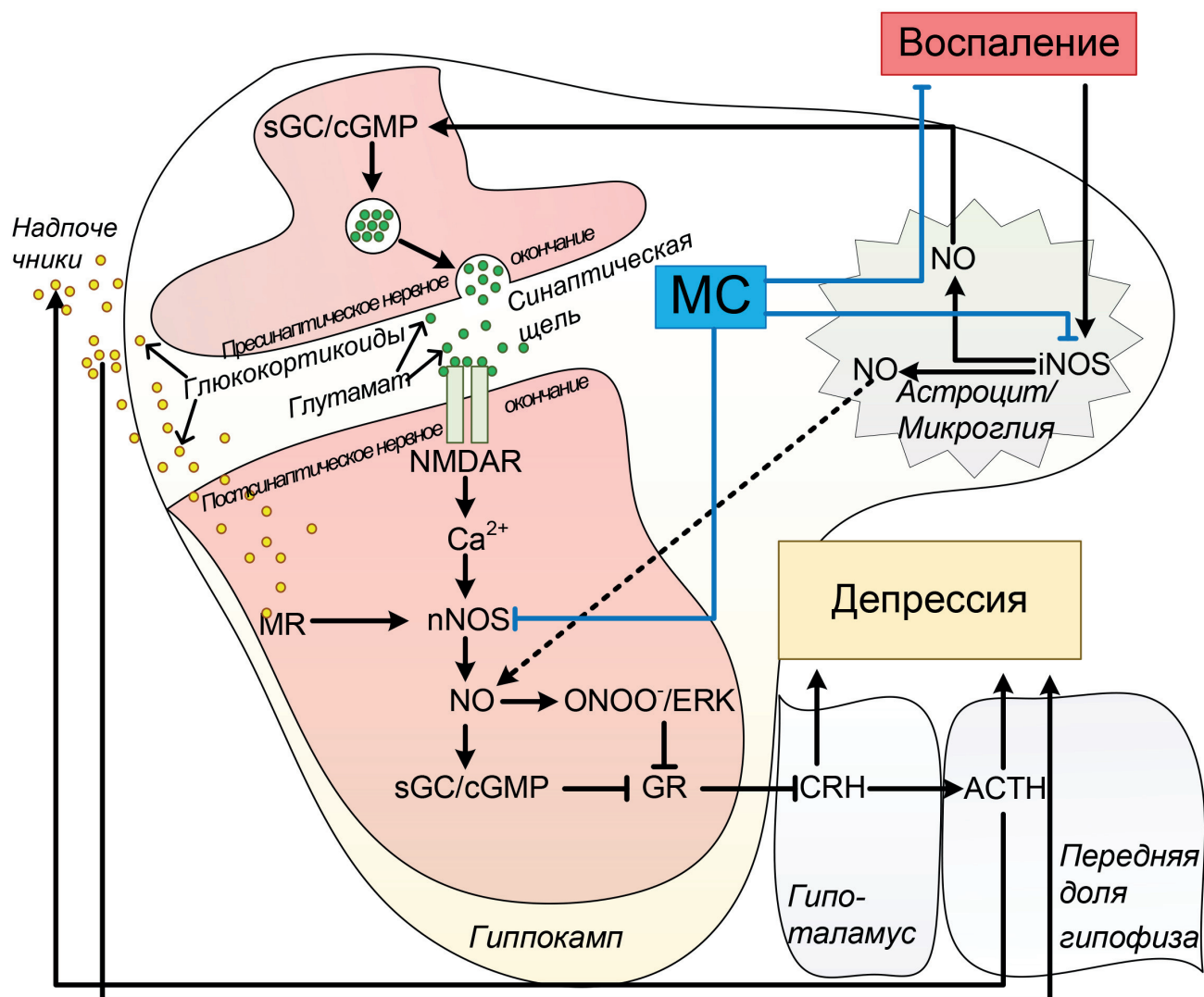


Рис. 7. Влияние MC на iNOS и nNOS способствует блокированию активности sGC/cGMP, снижению гипоталамической секреции CRH, секреции глюкокортикоидов и препятствует развитию депрессивного состояния

го поведения, так как в нормальных условиях их низкий уровень поддерживается отрицательной обратной связью [131].

Фармакологическое ингибирование NOS может снижать показатели депрессивноподобного поведения на животных моделях [129] (рис. 7). Mayer et al. [132] показали, что *in vitro* MC полностью ингибирует NOS при концентрации 30 мкМ, а также ингибирует sGC, но в меньшей степени (50% ингибирования – при 60 мкМ и максимальное ингибирование 72% – при 1 мМ), из-за чего авторы сделали вывод, что MC нельзя считать мощным и селективным ингибитор NOS, хотя ранее было показано, что MC ингибирует продукцию GMP [133]. Позже было показано ингибирующее действие MC на NOS и sGC не только *in vitro* [134], но и *in vivo* [135, 136]. Однако MC использовался в достаточно высоких

концентрациях: до 1 мМ – при введении через микродиализный зонд [135] и 100 мг/кг – при внутрибрюшинных инъекциях [136]. Хотя последующие исследования показали, что MC уже в концентрации 3 мг/кг (внутривенная инъекция) специфически ингибирует iNOS при липополисахарид-индуцированном стрессе [137]. В принципе, стоит отметить, что дозозависимость эффекта MC на ингибирование NOS нуждается в дальнейшем изучении, потому что высокие концентрации MC сами по себе могут быть токсичны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, MC является плейотропным препаратом, который может одновременно действовать на несколько сигнальных путей, которые,

как правило, между собой крайне тесно переплетаются. Множественные эффекты МС крайне важно учитывать при проведении клинических испытаний. Кроме того, МС обладает крайне интересной фармакодинамикой, которая зачастую не учитывалась при дизайне некоторых клинических испытаний и послужила причиной их неудачи [18]. Данный обзор направлен на то, чтобы обобщить и в будущих исследованиях учитывать максимально все возможные эффекты МС при воздействии на ЦНС, принимать во внимание переплетения между апоптотическими путями, про/противовоспалительными процессами, сигнальными каскадами, которые регулируют митохондриальный биогенез, антиоксидатную защиту, уровни нейромедиаторов и неправильно свернутых и агрегированных белков. Глубокое и всестороннее понимание всех возможных эпигенетических, биохимических и физиологических последствий употребления МС позволит более корректно планировать эксперименты для оценки его нейропротекторных свойств.

**Вклад авторов.** А.П. Гуреев – написание текста, И.С. Садовникова – поиск и аннотация статей, подготовка рисунков, В.Н. Попов – концепция и руководство.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в области научной деятельности на 2020–2022 гг. (проект № FZGU-2020-0044), стипендии Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (проект № СП-2802.2021.4), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных и по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-1375.2022.5).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- O'Neil, M. J. (2013) *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry, England.
- Deutsches Reich Patent no. 1886, December 15, 1877 Badische Anilin- und Sodafabrik [BASF] (Mannheim, Germany), "Verfahren zur Darstellung blauer Farbstoffe aus Dimethylanilin und anderen tertiären aromatischen Monaminen" (Method for preparation of blue dyes from dimethylaniline and other tertiary aromatic monoamines), Deutsches Reich Patent no. 1886 (December 15, 1877).
- Berneth, H. (2008) *Azine dyes. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Germany.
- Delpont, A., Harvey, B. H., Petzer, A., and Petzer, J. P. (2017) The monoamine oxidase inhibition properties of selected structural analogues of methylene blue, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **325**, 1–8, doi: 10.1016/j.taap.2017.03.026.
- Gaudette, N. F., and Lodge, J. W. (2005) Determination of methylene blue and leucomethylene blue in male and female Fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse urine, *J. Anal. Toxicol.*, **29**, 28–33, doi: 10.1093/jat/29.1.28.
- Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., and Mandelkow, E. (2011) "Lest we forget you – methylene blue...", *Neurobiol. Aging*, **32**, 2325.e7–2325.e2.325E16, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
- Ehrlich, P., and Leppmann, A., (1890) Ueber schmerzstillende Wirkung des Methylenblau, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **16**, 493–494.
- Bodoni, P. (1899) Dell'azione sedativa del bleu di metilene in varie forme di psicosi [in Italian], *Clin. Med. Ital.*, pp. 217–222.
- Ohlow, M. J., and Moosmann, B. (2011) Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure, *Drug Discov. Today*, **16**, 119–131, doi: 10.1016/j.drudis.2011.01.001.
- Alleksaht, W. J. (1938) The use of methylene blue in the treatment of catatonic dementia praecox patients, *Psychiatric Quarterly*, **12**, 245–252.
- Kajdi, L., and Taylor, C. V. (1938) The use of intravenous methylene blue in status convulsivus, *Am. J. Insanity*, **94**, 1369–1376, doi: 10.1176/ajp.94.6.1369.
- Naylor, G. J., and Smith, A. H. (1981) Vanadium: a possible aetiological factor in manic depressive illness, *Psychol. Med.*, **11**, 249–256, doi: 10.1017/s0033291700052065.
- Naylor, G. J., Martin, B., Hopwood, S. E., and Watson, Y. (1986) A two-year double-blind crossover trial of the prophylactic effect of methylene blue in manic depressive psychosis, *Biol. Psychiatry*, **21**, 915–920, doi: 10.1016/0006-3223(86)90265-9.
- Martinez, J. L., Jensen, R. A., Vasquez, B. J., McGuinness, T., and McGaugh, J. L. (1978) Methylene blue alters retention of inhibitory avoidance responses, *Psychobiology*, **6**, 387–390, doi: 10.3758/BF03326744.
- Wischnik, C. M., Edwards, P. C., Lai, R. Y., Roth, M., and Harrington, C. R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by

- phenothiazines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11213-11218, doi: 10.1073/pnas.93.20.11213.
16. Wischik, C. M., Staff, R. T., Wischik, D. J., Bentham, P., Murray, A. D., et al. (2015) Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **44**, 705-720, doi: 10.3233/JAD-142874.
  17. Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., et al. (2016) Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial, *Lancet*, **388**, 2873-2884, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31275-2.
  18. Hashweh, N. N., Bartochowski, Z., Khoury, R., and Grossberg, G. T. (2020) An evaluation of hydromethylthionine as a treatment option for Alzheimer's disease, *Expert Opin. Pharmacother.*, **21**, 619-627, doi: 10.1080/14656566.2020.1719066.
  19. Sontag, E. M., Lotz, G. P., Agrawal, N., Tran, A., Aron, R., et al. (2012) Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models, *J. Neurosci.*, **32**, 11109-11119, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0895-12.2012.
  20. Heidari, R., Monnier, V., Martin, E., and Tricoire, H. (2015) Methylene blue partially rescues heart defects in a drosophila model of Huntington's disease, *J. Huntington's Dis.*, **4**, 173-186, doi: 10.3233/JHD-140130.
  21. Bariotto-Dos-Santos, K., Padovan-Neto, F. E., Bortolanza, M., Dos-Santos-Pereira, M., Raisman-Vozari, R., et al. (2019) Repurposing an established drug: an emerging role for methylene blue in L-DOPA-induced dyskinesia, *Eur. J. Neurosci.*, **49**, 869-882, doi: 10.1111/ejn.14079.
  22. Bhurtel, S., Katila, N., Neupane, S., Srivastav, S., Park, P. H., et al. (2018) Methylene blue protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity by upregulating brain-derived neurotrophic factor, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1431**, 58-71, doi: 10.1111/nyas.13870.
  23. Stelmashook, E. V., Genrikhs, E. E., Mukhaleva, E. V., Kapkaeva, M. R., Kondratenko, R. V., et al. (2019) Neuroprotective effects of methylene blue *in vivo* and *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 455-459, doi: 10.1007/s10517-019-04548-3.
  24. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Voronkov, D. N., Novikova, S. V., Alexandrova, O. P., et al. (2020) The delayed neuroprotective effect of methylene blue in experimental rat brain trauma, *Antioxidants*, **9**, 377, doi: 10.3390/antiox9050377.
  25. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Voronkov, D. N., Novikova, S. V., Alexandrova, O. P., et al. (2020) The single intravenous administration of methylene blue after traumatic brain injury diminishes neurological deficit, blood-brain barrier disruption and decrease in the expression of S100 protein in rats, *Brain Res.*, **1740**, 146854, doi: 10.1016/j.brainres.2020.146854.
  26. Lu, Q., Tucker, D., Dong, Y., Zhao, N., and Zhang, Q. (2016) Neuroprotective and functional improvement effects of methylene blue in global cerebral ischemia, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 5344-5355, doi: 10.1007/s12035-015-9455-0.
  27. Li, L., Yang, R., Li, P., Lu, H., Hao, J., et al. (2018) Combination treatment with methylene blue and hypothermia in global cerebral ischemia, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2042-2055, doi: 10.1007/s12035-017-0470-1.
  28. Lin, Z. H., Wang, S. Y., Chen, L. L., Zhuang, J. Y., Ke, Q. F., et al. (2017) Methylene blue mitigates acute neuroinflammation after spinal cord injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation in microglia, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 391, doi: 10.3389/fncel.2017.00391.
  29. Dibaj, P., Zschüntzsch, J., Steffens, H., Scheffel, J., Göricke, B., et al. (2012) Influence of methylene blue on microglia-induced inflammation and motor neuron degeneration in the SOD1(G93A) model for ALS, *PLoS One*, **7**, e43963, doi: 10.1371/journal.pone.0043963.
  30. Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Song, C., Gluck, M., and Ehrhart, J. (2005) Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration, *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 1117-1139, doi: 10.1089/ars.2005.7.1117.
  31. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., and Starkov, A. A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 200-214, doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.
  32. Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H. P. (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 937-942, doi: 10.1016/j.plaphy.2004.09.010.
  33. Cadenas, S. (2018) Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 940-950, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019.
  34. Grundlingh, J., Dargan, P. I., El-Zanfaly, M., and Wood, D. M. (2011) 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death, *J. Med. Toxicol.*, **7**, 205-212, doi: 10.1007/s13181-011-0162-6.
  35. Wen, Y., Li, W., Poteet, E. C., Xie, L., Tan, C., et al. (2011) Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16504-16515, doi: 10.1074/jbc.M110.208447.
  36. Harrop, G. A., and Barron, E. S. (1928) Studies on blood cell metabolism: I. The effect of methylene blue and other dyes upon the oxygen consumption of mammalian and avian erythrocytes, *J. Exp. Med.*, **48**, 207-223, doi: 10.1084/jem.48.2.207.
  37. Barron, E. S., and Hoffman, L. A. (1930) The catalytic effect of dyes on the oxygen consumption of living cells, *J. Gen. Physiol.*, **13**, 483-494, doi: 10.1085/jgp.13.4.483.
  38. Elliott, K. A., and Greig, M. E. (1938) The distribution of the succinic oxidase system in animal tissues, *Biochem. J.*, **32**, 1407-1423, doi: 10.1042/bj0321407.



39. Slater, E. C. (1949) A respiratory catalyst required for the reduction of cytochrome *c* by cytochrome *b*, *Biochem. J.*, **45**, 14-30, doi: 10.1042/bj0450014.
40. Redfearn, E. R. (1961) The role of ubiquinone (coenzyme Q) and its homologues in mediating the reduction of methylene blue by succinate in heart-muscle preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 581-583, doi: 10.1016/0006-3002(61)90220-7.
41. Tönz, O. (1968) The congenital methemoglobinemias. Physiology and pathophysiology of the hemoglobin metabolism, *Bibliotheca Haematologica*, **28**, 1-146.
42. Visarius, T. M., Stucki, J. W., and Lauterburg, B. H. (1997) Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria, *FEBS Lett.*, **412**, 157-160, doi: 10.1016/s0014-5793(97)00767-9.
43. Gureev, A. P., Samoylova, N. A., Potanina, D. V., and Popov, V. N. (2021) Effect of methylene blue and its metabolite – azure I – on bioenergetic parameters of intact mice brain mitochondria, *Biomed. Khim.*, **67**, 485-490, doi: 10.18097/PBMC20216706485.
44. Callaway, N. L., Riha, P. D., Wrubel, K. M., McCollum, D., and Gonzalez-Lima, F. (2002) Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats, *Neurosci. Lett.*, **332**, 83-86, doi: 10.1016/s0304-3940(02)00827-3.
45. Tretter, L., Horvath, G., Hölgyesi, A., Essek, F., and Adam-Vizi, V. (2014) Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.*, **77**, 317-330, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.024.
46. Gureev, A. P., Syromyatnikov, M. Y., Gorbacheva, T. M., Starkov, A. A., and Popov, V. N. (2016) Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice, *Neurosci. Res.*, **113**, 19-27, doi: 10.1016/j.neures.2016.07.006.
47. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., Popov, V. N., and Starkov, A. A. (2019) Methylene blue does not bypass Complex III antimycin block in mouse brain mitochondria, *FEBS Lett.*, **593**, 499-503, doi: 10.1002/1873-3468.13332.
48. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., Laver, D. A., Khorolskaya, V. G., Syromyatnikov, M. Y., et al. (2019) Methylene blue elicits non-genotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and protects brain mitochondria from rotenone toxicity, *J. Appl. Biomed.*, **17**, 107-114, doi: 10.32725/jab.2019.008.
49. Atamna, H., Atamna, W., Al-Eyd, G., Shanower, G., and Dhahbi, J. M. (2015) Combined activation of the energy and cellular-defense pathways may explain the potent anti-senescence activity of methylene blue, *Redox Biol.*, **6**, 426-435, doi: 10.1016/j.redox.2015.09.004.
50. Zhang, X., Rojas, J. C., and Gonzalez-Lima, F. (2006) Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina, *Neurotox. Res.*, **9**, 47-57, doi: 10.1007/BF03033307.
51. Poteet, E., Winters, A., Yan, L. J., Shufelt, K., Green, K. N., et al. (2012) Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives, *PLoS One*, **7**, e48279, doi: 10.1371/journal.pone.0048279.
52. Mikulás, K., Komlódi, T., Földes, A., Sváb, G., Horváth, G., et al. (2020) Bioenergetic Impairment of triethylene glycol dimethacrylate- (TEGDMA-) treated dental pulp stem cells (DPSCs) and isolated brain mitochondria are amended by redox compound methylene blue, *Materials*, **13**, 3472, doi: 10.3390/ma13163472.
53. Sváb, G., Kokas, M., Sipos, I., Ambrus, A., and Tretter, L. (2021) Methylene blue bridges the inhibition and produces unusual respiratory changes in complex III-inhibited mitochondria. Studies on rats, mice and guinea pigs, *Antioxidants*, **10**, 305, doi: 10.3390/antiox10020305.
54. Irwin, M. H., Parameshwaran, K., and Pinkert, C. A. (2013) Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 34-40, doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.009.
55. Bahn, G., and Jo, D. G. (2019) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through modulation of NRF2, *Neuromol. Med.*, **21**, 1-11, doi: 10.1007/s12017-018-08523-5.
56. Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., et al. (2005) Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J. Biol. Chem.*, **280**, 7614-7623, doi: 10.1074/jbc.M408714200.
57. Hattori, M., Sugino, E., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., et al. (2008) Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**, 158-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.001.
58. Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., et al. (2014) Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3716-3732, doi: 10.1093/hmg/ddu080.
59. Hochgräfe, K., Sydow, A., Matenia, D., Cadinu, D., Könen, S., et al. (2015) Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau, *Acta Neuropathol. Commun.*, **3**, 25, doi: 10.1186/s40478-015-0204-4.
60. Necula, M., Breydo, L., Milton, S., Kaye, R., van der Veer, W. E., et al. (2007) Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization, *Biochemistry*, **46**, 8850-8860, doi: 10.1021/bi700411k.
61. Lee, B. I., Suh, Y. S., Chung, Y. J., Yu, K., and Park, C. B. (2017) Shedding light on Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis: photosensitized methylene blue inhibits self-assembly of  $\beta$ -amyloid peptides and disintegrates their aggregates, *Sci. Rep.*, **7**, 7523, doi: 10.1038/s41598-017-07581-2.
62. Berrocal, M., Corbacho, I., Gutierrez-Merino, C., and Mata, A. M. (2018) Methylene blue activates the PMCA activity and cross-interacts with amyloid  $\beta$ -peptide, blocking A $\beta$ -mediated PMCA inhibition, *Neuropharmacology*, **139**, 163-172, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.012.

63. Berrocal, M., Caballero-Bermejo, M., Gutierrez-Merino, C., and Mata, A. M. (2019) Methylene blue blocks and reverses the inhibitory effect of Tau on PMCA function, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3521, doi: 10.3390/ijms20143521.
64. Illarioshkin, S. N., Klyushnikov, S. A., Vigont, V. A., Seliverstov, Y. A., and Kaznacheeva, E. V. (2018) Molecular pathogenesis in Huntington's disease, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1030-1039, doi: 10.1134/S0006297918090043.
65. Cavaliere, P., Torrent, J., Prigent, S., Granata, V., Pauwels, K., et al. (2013) Binding of methylene blue to a surface cleft inhibits the oligomerization and fibrillization of prion protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 20-28, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.005.
66. Paré, B., Lehmann, M., Beaudin, M., Nordström, U., Saikali, S., et al. (2018) Misfolded SOD1 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Sci. Rep.*, **8**, 14223, doi: 10.1038/s41598-018-31773-z.
67. Yamashita, M., Nonaka, T., Arai, T., Kametani, F., Buchman, V. L., et al. (2009) Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models, *FEBS Lett.*, **583**, 2419-2424, doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.042.
68. Musteikyte, G., Ziaunys, M., and Smirnovas, V. (2020) Methylene blue inhibits nucleation and elongation of SOD1 amyloid fibrils, *PeerJ*, **8**, e9719, doi: 10.7717/peerj.9719.
69. Vaccaro, A., Patten, S. A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., et al. (2012) Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*, *PLoS One*, **7**, e42117, doi: 10.1371/journal.pone.0042117.
70. Vaccaro, A., Patten, S. A., Aggad, D., Julien, C., Maios, C., et al. (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity *in vivo*, *Neurobiol. Dis.*, **55**, 64-75, doi: 10.1016/j.nbd.2013.03.015.
71. Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 179-188, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.
72. Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., and Sutherland, C. (2015) Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of  $\beta$ -TrCP and GSK-3, *Biochem. Soc. Trans.*, **43**, 611-620, doi: 10.1042/BST20150011.
73. Zenkov, N. K., Kozhin, P. M., Chechushkov, A. V., Martinovich, G. G., Kandalintseva, N. V., et al. (2017) Mazes of Nrf2 regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 556-564, doi: 10.1134/S0006297917050030.
74. El Sayed, N. S., and Sayed, A. S. (2019) Protective effect of methylene blue on TNBS-induced colitis in rats mediated through the modulation of inflammatory and apoptotic signalling pathways, *Arch. Toxicol.*, **93**, 2927-2942, doi: 10.1007/s00204-019-02548-w.
75. Kaur, S., and Benov, L. T. (2020) Methylene blue induces the soxRS regulon of *Escherichia coli*, *Chem. Biol. Interact.*, **329**, 109222, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109222.
76. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., and Popov, V. N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  signaling pathways, *Front. Genet.*, **10**, 435, doi: 10.3389/fgene.2019.00435.
77. Fernandez-Marcos, P. J., and Auwerx, J. (2011) Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis, *Am. J. Clin. Nutr.*, **93**, 884S-890S, doi: 10.3945/ajcn.110.001917.
78. Islam, H., Hood, D. A., and Gurd, B. J. (2020) Looking beyond PGC-1 $\alpha$ : emerging regulators of exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis and their activation by dietary compounds, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **45**, 11-23, doi: 10.1139/apnm-2019-0069.
79. Xie, L., Li, W., Winters, A., Yuan, F., Jin, K., et al. (2013) Methylene blue induces macroautophagy through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway to protect neurons from serum deprivation, *Front. Cell Neurosci.*, **7**, 56, doi: 10.3389/fncel.2013.00056.
80. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response, *Mol. Cell*, **40**, 280-293, doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
81. Telli, M. L., Nagata, H., Wapnir, I., Acharya, C. R., Zablotsky, K., et al. (2021) Intratumoral plasmid IL12 expands CD8<sup>+</sup> T cells and induces a CXCR3 gene signature in triple-negative breast tumors that sensitizes patients to anti-PD-1 therapy, *Clin. Cancer Res.*, **27**, 2481-2493, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3944.
82. Wong, E., and Cuervo, A. M. (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases, *Nat. Neurosci.*, **13**, 805-811, doi: 10.1038/nn.2575.
83. Medina, D. X., Caccamo, A., and Oddo, S. (2011) Methylene blue reduces  $\alpha\beta$  levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity, *Brain Pathol.*, **21**, 140-149, doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00430.x.
84. Congdon, E. E., Wu, J. W., Myeku, N., Figueroa, Y. H., Herman, M., et al. (2012) Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy *in vitro* and *in vivo*, *Autophagy*, **8**, 609-622, doi: 10.4161/auto.19048.
85. Jiang, Z., Watts, L. T., Huang, S., Shen, Q., Rodriguez, P., et al. (2015) The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core, *PLoS One*, **10**, e0131929, doi: 10.1371/journal.pone.0131929.
86. Zhao, M., Liang, F., Xu, H., Yan, W., and Zhang, J. (2016) Methylene blue exerts a neuroprotective effect against traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting microglial activation, *Mol. Med. Rep.*, **13**, 13-20, doi: 10.3892/mmr.2015.4551.
87. Di, Y., He, Y. L., Zhao, T., Huang, X., Wu, K. W., et al. (2015) Methylene blue reduces acute cerebral ischemic injury via the induction of mitophagy, *Mol. Med.*, **21**, 420-429, doi: 10.2119/molmed.2015.00038.

88. Gureev, A. P., Sadovnikova, I. S., Starkov, N. N., Starkov, A. A., and Popov, V. N. (2020) p62-Nrf2-p62 mitophagy regulatory loop as a target for preventive therapy of neurodegenerative diseases, *Brain Sci.*, **10**, 847, doi: 10.3390/brainsci10110847.
89. Murata, H., Takamatsu, H., Liu, S., Kataoka, K., Huh, N. H., et al. (2015) NRF2 regulates PINK1 expression under oxidative stress conditions, *PLoS One*, **10**, e0142438, doi: 10.1371/journal.pone.0142438.
90. Dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A., Oliveira, T. C., Gomes, V. M., et al. (2017) Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells, *BMC Cancer*, **17**, 194, doi: 10.1186/s12885-017-3179-7.
91. Lucky, S. S., Soo, K. C., and Zhang, Y. (2015) Nanoparticles in photodynamic therapy, *Chem. Rev.*, **115**, 1990-2042, doi: 10.1021/cr5004198.
92. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., et al. (2005) Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2**, 175-191, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
93. Eimon, P. M., Kratz, E., Varfolomeev, E., Hymowitz, S. G., Stern, H., et al. (2006) Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish, *Cell Death Differ.*, **13**, 1619-1630, doi: 10.1038/sj.cdd.4402015.
94. Bellail, A. C., Tse, M. C., Song, J. H., Phuphanich, S., Olson, J. J., et al. (2010) DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas, *J. Cell Mol. Med.*, **14**, 1303-1317, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00777.x.
95. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., et al. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.*, **13**, 1423-1433, doi: 10.1038/sj.cdd.4401950.
96. Wu, C. C., and Bratton, S. B. (2013) Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species, *Antioxid Redox Signal.*, **19**, 546-558, doi: 10.1089/ars.2012.4905.
97. Roy, S., and Nicholson, D. W. (2000) Cross-talk in cell death signaling, *J. Exp. Med.*, **192**, F21-F25.
98. Connolly, P. F., Jäger, R., and Fearnhead, H. O. (2014) New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes, *Front. Physiol.*, **5**, 149, doi: 10.3389/fphys.2014.00149.
99. Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. (2014) Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *J. Alzheimer's Dis.*, **42**, S125-S152, doi: 10.3233/JAD-132738.
100. Chen, C., Zhou, F., Zeng, L., Jiang, Z., and Hu, Z. (2019) Methylene blue offers neuroprotection after intracerebral hemorrhage in rats through the PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway, *J. Cell Physiol.*, **234**, 5304-5318, doi: 10.1002/jcp.27339.
101. Abdel-Salam, O., Omara, E., Youness, E., Khadrawy, Y., Mohammed, N., et al. (2014) Rotenone-induced nigrostriatal toxicity is reduced by methylene blue, *J. Neurorestoratol.*, **2**, 65-80, doi: 10.2147/JN.S49207.
102. Lee, K. K., and Boelsterli, U. A. (2014) Bypassing the compromised mitochondrial electron transport with methylene blue alleviates efavirenz/isoniazid-induced oxidant stress and mitochondria-mediated cell death in mouse hepatocytes, *Redox Biol.*, **2**, 599-609, doi: 10.1016/j.redox.2014.03.003.
103. Abdelkader, N. F., Farid, H. A., Youness, E. R., Abdel-Salam, O., and Zaki, H. F. (2020) The role of KATP channel blockade and activation in the protection against neurodegeneration in the rotenone model of Parkinson's disease, *Life Sci.*, **257**, 118070, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118070.
104. Pakavathkumar, P., Sharma, G., Kaushal, V., Foveau, B., and LeBlanc, A. C. (2015) Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine, *Sci. Rep.*, **5**, 13730, doi: 10.1038/srep13730.
105. Zhou, L., Flores, J., Noël, A., Beauchet, O., Sjöström, P. J., et al. (2019) Methylene blue inhibits Caspase-6 activity, and reverses Caspase-6-induced cognitive impairment and neuroinflammation in aged mice, *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**, 210, doi: 10.1186/s40478-019-0856-6.
106. Ahn, H., Kang, S. G., Yoon, S. I., Ko, H. J., Kim, P. H., et al. (2017) Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation, *Sci. Rep.*, **7**, 12409, doi: 10.1038/s41598-017-12635-6.
107. Amor, S., Puentes, F., Baker, D., and van der Valk, P. (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases, *Immunology*, **129**, 154-169, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x.
108. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., et al. (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget*, **9**, 7204-7218, doi: 10.18632/oncotarget.23208.
109. Zelová, H., and Hošek, J. (2013) TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances, *Inflamm. Res.*, **62**, 641-651, doi: 10.1007/s00011-013-0633-0.
110. Monaco, C., Andreacos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., et al. (2004) Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5634-5639, doi: 10.1073/pnas.0401060101.
111. Liu, J. J., Lu, L., Hu, F. Q., Yuan, H., Xu, Q., et al. (2018) Methylene blue attenuates renal ischemia-reperfusion injury by negative regulation of NLRP3 signaling pathway, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 2847-2853, doi: 10.26355/eurrev\_201805\_14986.
112. Zheng, J., and Li, Q. (2019) Methylene blue regulates inflammatory response in osteoarthritis by noncoding long chain RNA CILinc02, *J. Cell Biochem.*, **120**, 3331-3338, doi: 10.1002/jcb.27602.
113. Wang, S. W., and Sun, Y. M. (2014) The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (review), *Int. J. Oncol.*, **44**, 1032-1040, doi: 10.3892/ijo.2014.2259.
114. Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., and Saraiva, M. (2016) Balancing



- the immune response in the brain: IL-10 and its regulation, *J. Neuroinflamm.*, **13**, 297, doi: 10.1186/s12974-016-0763-8.
115. Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R. D. (1999) Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16513-16521, doi: 10.1074/jbc.274.23.16513.
  116. Shih, J. C., Chen, K., and Ridd, M. J. (1999) Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior, *Pol. J. Pharmacol.*, **51**, 25-29.
  117. Godar, S. C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K., et al. (2011) Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **14**, 1195-1207, doi: 10.1017/S1461145710001483.
  118. Watson, C., Bates, J., and Franczak, R. (2009) Serotonin regulation by astrocytes, *FASEB J.*, **23**, 790.2, doi: 10.1096/fasebj.23.1\_supplement.790.2.
  119. Paudel, P., Park, S. E., Seong, S. H., Jung, H. A., and Choi, J. S. (2019) Novel Diels-Alder type adducts from morus alba root bark targeting human monoamine oxidase and dopaminergic receptors for the management of neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6232, doi: 10.3390/ijms20246232.
  120. Ordway, G. A., Farley, J. T., Dilley, G. E., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., et al. (1999) Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression, *Brain Res.*, **847**, 71-79, doi: 10.1016/s0006-8993(99)02043-0.
  121. Aeschlimann, C., Cerny, T., and Küpfer, A. (1996) Inhibition of (mono)amine oxidase activity and prevention of ifosfamide encephalopathy by methylene blue, *Drug Metabol. Dispos.*, **24**, 1336-1339.
  122. Ramsay, R. R., Dunford, C., and Gillman, P. K. (2007) Methylene blue and serotonin toxicity: inhibition of monoamine oxidase A (MAO A) confirms a theoretical prediction, *Br. J. Pharmacol.*, **152**, 946-951, doi: 10.1038/sj.bjp.0707430.
  123. Harvey, B. H., Duvenhage, I., Viljoen, F., Scheepers, N., Malan, S. F., et al. (2010) Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues, *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1580-1591, doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.037.
  124. Delpont, A., Harvey, B. H., Petzer, A., and Petzer, J. P. (2014) Azure B and a synthetic structural analogue of methylene blue, ethylthioninium chloride, present with antidepressant-like properties, *Life Sci.*, **117**, 56-66, doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.005.
  125. Petzer, A., Harvey, B. H., Wegener, G., and Petzer, J. P. (2012) Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **258**, 403-409, doi: 10.1016/j.taap.2011.12.005.
  126. Reis, P. A., Gonçalves de Albuquerque, C. F., Maron-Gutierrez, T., Silva, A. R., and de Castro Faria Neto, H. C. (2017) Role of nitric oxide synthase in the function of the central nervous system under normal and infectious conditions, *Nitric Oxide Synthase*, IntechOpen, doi: 10.5772/67816.
  127. Czapski, G. A., Cakala, M., Chalimoniuk, M., Gajkowska, B., and Strosznajder, J. B. (2007) Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1694-1703, doi: 10.1002/jnr.21294.
  128. Zhou, X. Y., Zhang, F., Ying, C. J., Chen, J., Chen, L., et al. (2017) Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway, *Behav. Brain Res.*, **322**, 70-82, doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.046.
  129. Chen, H. J., Spiers, J. G., Sernia, C., and Lavidis, N. A. (2015) Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis, *Front. Neurosci.*, **9**, 3, doi: 10.3389/fnins.2015.00003.
  130. Zhou, Q. G., Zhu, L. J., Chen, C., Wu, H. Y., Luo, C. X., et al. (2011) Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor, *J. Neurosci.*, **31**, 7579-7590, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0004-11.2011.
  131. Gragnoli, C. (2014) Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome, *Appl. Clin. Genet.*, **7**, 43-53, doi: 10.2147/TACG.S39993.
  132. Mayer, B., Brunner, F., and Schmidt, K. (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 367-374, doi: 10.1016/0006-2952(93)90072-5.
  133. Ignarro, L. J., Burke, T. M., Wood, K. S., Wolin, M. S., and Kadowitz, P. J. (1984) Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**, 682-690.
  134. Luo, D., Das, S., and Vincent, S. R. (1995) Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase, *Eur. J. Pharmacol.*, **290**, 247-251, doi: 10.1016/0922-4106(95)00084-4.
  135. Volke, V., Wegener, G., Vasar, E., and Rosenberg, R. (1999) Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity *in vivo*, *Brain Res.*, **826**, 303-305, doi: 10.1016/s0006-8993(99)01253-6.
  136. Deutsch, S., Rosse, R., Paul, S., Tomasino, V., Koetznner, L., et al. (1996) 7-Nitroindazole and methylene blue, inhibitors of neuronal nitric oxide synthase and NO-stimulated guanylate cyclase, block MK-801-elicited behaviors in mice, *Neuropsychopharmacology*, **15**, 37-43, doi: 10.1016/0893-133X(95)00153-5.
  137. Lomniczi, A., Cebral, E., Canteros, G., McCann, S. M., and Rettori, V. (2000) Methylene blue inhibits the increase of inducible nitric oxide synthase activity induced by stress and lipopolysaccharide in the medial basal hypothalamus of rats, *Neuroimmunomodulation*, **8**, 122-127, doi: 10.1159/000054271.

## MOLECULAR MECHANISMS OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF METHYLENE BLUE

### Review

**A. P. Gureev<sup>1,2\*</sup>, I. S. Sadovnikova<sup>1</sup>, and V. N. Popov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Voronezh State University, 394018 Voronezh, Russia; E-mail: gureev@bio.vsu.ru

<sup>2</sup> Voronezh State University of Engineering Technologies, 394036 Voronezh, Russia

Methylene blue (MB) is the first fully synthetic compound that found its way into medicine over 120 years ago to treat malaria. Today MB is approved for the treatment of methemoglobinemia, but there are premises for its repositioning towards neuroprotection. The promise of this compound is confirmed by the effectiveness in the treatment of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, models of traumatic brain injury, amniotic lateral sclerosis, depressive disorders, etc. in various models. However, the goal of this review is not so much to focus on describing the therapeutic effects of MB in the treatment of various neurodegenerations, but to delve into the mechanisms of direct or indirect effect by this drug on the signaling pathways. MB can act as an alternative electron carrier in the mitochondrial respiratory chain in condition of disturbed electron transport chain. It can have anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, inhibit monoamine oxidases (MAOs) and NO synthase, activate signaling pathways that provide renewal of the mitochondrial pool – mitochondrial biogenesis and autophagy, and prevent the aggregation of misfolded proteins. Understanding and comprehensive study of all aspects of the direct and indirect action of MB, and not just any one effect, can help in its further research, including at the clinical level.

*Keywords:* methylene blue, neurodegeneration, Alzheimer's disease, tau protein, alternative electron transport, Nrf2/ARE signaling pathway, apoptosis, autophagy, inflammation, monoamine oxidase, NO synthase

## БАКТЕРИЯ *Neisseria gonorrhoeae*: СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ

### Обзор

© 2022 В.Ю. Савицкая<sup>1</sup>, М.В. Монахова<sup>2</sup>, Ю.В. Якушкина<sup>1</sup>,  
И.И. Боровикова<sup>3</sup>, Е.А. Кубарева<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
химический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: kubareva@belozersky.msu.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.04.2022

После доработки 12.07.2022

Принята к публикации 12.07.2022

Организм *Neisseria gonorrhoeae* (грамотрицательный диплококк) является патогеном человека и возбудителем гонореи – инфекционного заболевания, передаваемого половым путём. Бактерия использует различные способы, чтобы адаптироваться к условиям окружающей среды и эффективно размножаться в организме человека, такие как регуляция экспрессии генов поверхностных белков и липоолигосахаридов (например, экспрессия различных форм пилина). Системы репарации повреждений в ДНК играют важную роль в способности бактерии выживать в организме-хозяине. В данном обзоре описаны системы репарации ДНК *N. gonorrhoeae*, а также их роль в патогенезе бактерии. Особое внимание уделено системе репарации «мисматчей» (MMR) и функционированию белков MutS и MutL, а также рассмотрена роль этих белков в процессе регуляции антигенной вариации пилина патогена *N. gonorrhoeae*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** система репарации «мисматчей», репарация повреждений ДНК, эксцизионная репарация, MutS, MutL, антигенная вариация, гомологичная рекомбинация, G-квадруплекс, *Neisseria gonorrhoeae*.

DOI: 10.31857/S0320972522090020, EDN: AZORAR

### ВВЕДЕНИЕ

*Neisseria gonorrhoeae* принадлежит к роду *Neisseria*, в который входят два патогенных вида *N. gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*, являющиеся причинами возникновения заболеваний гонореи и бактериального менингита у человека [1]. Организм *N. gonorrhoeae* в основном поражает слизистую оболочку органов репродуктивной системы человека. В большинстве

случаев заболевание представляет собой неосложнённую инфекцию [2, 3]. С другой стороны, у некоторых пациентов могут возникать более серьёзные последствия, включая воспаление маточных труб у женщин и бесплодие – у мужчин [4]. Исследования ВОЗ выявили клинические штаммы *N. gonorrhoeae*, устойчивые к большинству известных антибиотиков [5, 6]. Именно поэтому необходим поиск новых методов лечения для предотвращения распростране-

Принятые сокращения: AP-сайт – апуриновый или апириимидиновый сайт; β-«зажим» – β-субъединица ДНК-полимеразы III; BER – система эксцизионной репарации оснований; STD – C-концевой домен белка; G4 – G-квадруплекс; LOS – липоолигосахарид; MMR – система репарации некомплементарных пар нуклеотидов; NER – система эксцизионной репарации нуклеотидов; ngMutL – MutL из *Neisseria gonorrhoeae*; ngMutS – MutS из *Neisseria gonorrhoeae*; NTD – N-концевой домен белка; 8-oxodG – 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин; V.ngAXIII и V.ngAXIV – эндонуклеазы Vsg из *Neisseria gonorrhoeae*; VSP – система репарации очень коротких участков.

\* Адресат для корреспонденции.



ния заболевания. Как и многие грамотрицательные бактерии, *N. gonorrhoeae* обладает широким спектром факторов вирулентности: пили IV-го типа, состоящие из белка пилина, поверхностные белки Ора, модифицированные липоолигосахариды (LOS), белок внешней мембраны – порин (PorA и PorB), протеаза IgA и т.д. [3, 7].

Первым этапом патогенеза является прикрепление бактерий к эпителию слизистой оболочки [3]. За этот процесс в *N. gonorrhoeae* отвечают пили IV-го типа (type IV pili – Tfp) [8]. Пили преимущественно состоят из белка пилина (PilE) и являются необходимым фактором вирулентности бактерии. В образовании пилей, кроме PilE, участвуют другие белки, способствующие правильной сборке пилей. Также на конце пилей и внутри мембраны располагается белок PilC, отвечающий за прикрепление к эпителиальным клеткам человека [9, 10]. Для того чтобы «ускользнуть» от иммунного ответа, пили IV-го типа патогена *N. gonorrhoeae* претерпевают антигенную вариацию (экспрессию различных форм одного и того же антигена) с помощью механизма гомологичной рекомбинации, что приводит к синтезу различных вариантов пилина [11, 12].

Вариация фаз (регуляция экспрессии генов [2]) белков внешней мембраны Ора *N. gonorrhoeae* – ещё один способ защиты от иммунного ответа организма-хозяина [13]. В ходе этого процесса изменяется количество пентамерных повторов (5'-СТСТТ-3') в последовательности, кодирующей сигнальный пептид Ора, что влияет на синтез этих белков [14]. В отличие от пилей, экспрессия генов, кодирующих белок Ора, не требуется для начального прикрепления *N. gonorrhoeae* к клеткам хозяина. Однако после этого этапа белки Ора участвуют в связывании рецепторов клеток человека через свои гипервариабельные области [3].

Другим важнейшим фактором, обеспечивающим высокую вирулентность *N. gonorrhoeae*, является порин (Por) – белок внешней мембраны клетки, содержание которого составляет примерно 60% от общего содержания белков у бактерии [15]. Его основная функция – перенос ионов и питательных веществ через внешнюю мембрану, однако он также является фактором, защищающим патоген от иммунного ответа человека [16]. Каскадная система протеолитических ферментов, которая необходима для гуморального ответа организма на действие

**Таблица 1.** Некоторые механизмы защиты *N. gonorrhoeae* от иммунного ответа организма-хозяина

Защитный механизм	Факторы вирулентности	Результат	
Антигенная вариация	пили IV-го типа	синтез различных форм белка пилина	распознавание антигена клетками организма-хозяина не реализуется
Вариация фаз	Ора	подавление синтеза поверхностного белка Ора	
	LOS	синтез фрагментов сиаловой кислоты	
Имитация клеток организма-хозяина	Por	связывание с белковым комплексом C4bP каскада классического пути комплемента	инактивация классического пути системы комплемента
	LOS с фрагментами сиаловой кислоты	связывание с фактором H каскада альтернативного пути комплемента	инактивация альтернативного пути системы комплемента
Инактивация белков иммунного ответа организма-хозяина	LOS, содержащие липид А	деградация белка C3b с помощью фактора I	
Экспрессия белков с окислительно-восстановительной функцией, белков систем репарации	каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, метионин-сульфоксид-редуктаза, белки систем репарации ДНК	восстановление окислительных повреждений в ДНК; предотвращение генетических мутаций	

чужеродных агентов и реализации иммунного ответа в целом, называется системой комплемента и активируется классическим или альтернативным путями. Регуляторный участник классического пути системы комплемента, белковый комплекс C4Bp, узнает элементы клеток организма-хозяина, предотвращая иммунную атаку на собственные клетки. Пор *N. gonorrhoeae* эффективно связывается как с C4Bp, так и с фактором H – сывороточным гликопротеином, функции которого также заключаются в защите человеческих клеток от иммунной атаки, но во время активации альтернативного пути [17, 18]. В результате клетки патогена расцениваются как человеческие, что подавляет иммунный ответ организма (табл. 1).

В подавлении альтернативного пути системы комплемента человека задействованы липоолигосахариды (LOS) *N. gonorrhoeae* на поверхности внешней мембраны клетки (табл. 1) [8]. По структуре LOS *N. gonorrhoeae* подобны широко распространённым бактериальным липоолигосахаридам, однако не содержат полисахаридных цепей O-антигена, которые легко бы распознавались иммунной системой организма-хозяина при инфицировании [19]. Более того, LOS *N. gonorrhoeae* подвергаются вариации фаз. В результате одной нуклеотидной замены, приводящей к сдвигу рамки считывания в генах гликозилтрансферазы, липоолигосахариды бактерии приобретают различные углеводные фрагменты [20, 21]. В качестве примера можно привести процессы с участием сиалированных липоолигосахаридов на поверхности клетки бактерии *N. gonorrhoeae* [22, 23]. Остатки сиаловой кислоты присутствуют на поверхности клеток организма-хозяина и взаимодействуют с фактором H. Синтезируя сиалированные липоолигосахариды, *N. gonorrhoeae* имитирует клетки человека, связавшиеся с фактором H, поэтому система комплемента не распознаёт патогенные клетки [24].

Избежать атаки иммунной системы человека также позволяют липоолигосахариды *N. gonorrhoeae*, содержащие липид А. Липид А связывается с белком C3b каскада альтернативной системы комплемента человека и вызывает деградацию этого белка в присутствии фактора I (табл. 1) [25]. В результате каскад инактивируется, а клетки патогена не подвергаются лизису [26]. Таким образом, с помощью перечисленных выше способов *N. gonorrhoeae* эффективно колонизируется на поверхности эпителиальных клеток организма-хозяина.

На эволюцию и адаптацию микроорганизмов влияют две противоположные силы: сохранение генетической информации и со-

здание подходящего уровня генетической изменчивости, на который может воздействовать отбор. *N. gonorrhoeae* в процессе своей жизнедеятельности подвергается воздействию нейтрофилов организма-хозяина, которые производят различные активные формы кислорода и азота [8]. Для защиты от окислительных агентов бактерия выработала защитные механизмы, заключающиеся в экспрессии многочисленных белков, таких как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, метионин-сульфоксид-редуктаза и др. [27–30]. Сохранять генетическую информацию в таких стрессовых условиях помогают различные системы репарации ДНК, присутствующие в бактерии. Однако о механизмах восстановления поврежденной ДНК *N. gonorrhoeae* известно немного.

Особую роль в выживаемости и изменчивости *N. gonorrhoeae* отводят системе репарации некомplementарных пар нуклеотидов, «мисматчей» (MMR), главная задача которой заключается в устранении «ошибок», допущенных ДНК-полимеразой в процессе репликации [31]. Эффективное функционирование системы MMR снижает количество мутаций и поддерживает стабильность генома, а нарушение её работы приводит к повышенной изменчивости и адаптивности бактерии.

В данном обзоре обобщены последние данные, касающиеся особенностей функционирования различных систем репарации ДНК в клетках *N. gonorrhoeae*. Направленное воздействие на функционирование белков систем репарации ДНК этой бактерии может рассматриваться как перспективный подход к терапии гонореи.

## РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Поскольку *N. gonorrhoeae* является патогеном человека и обитает в основном в организме хозяина, полагают, что эта бактерия, как правило, реже подвергается прямому УФ-облучению, обезвоживанию и воздействию других экстремальных условий [5]. Основные повреждения ДНК клетки патогена могут возникнуть в результате воздействия веществ, присутствующих в организме человека. Как и все живые организмы, *N. gonorrhoeae* в том или ином виде имеет основные системы репарации повреждений ДНК [32]. К ним относятся прямое исправление повреждений, эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), репарация «мисматчей» (MMR), репарация очень корот-

ких участков (VSP), репарация с участием систем рекомбинации (табл. 2).

Существует точка зрения, что у *N. gonorrhoeae* отсутствует одна из наиболее важных бактериальных систем репарации ДНК – SOS-система, которая активируется в ответ на серьёзные повреждения ДНК, такие как остановка репликационной вилки [33, 34]. Это утверждение основано на том, что в клетках *N. gonorrhoeae* не обнаружен ген белка транскрипционного репрессора LexA, который в нормальных условиях подавляет экспрессию генов SOS-системы. При формировании SOS-ответа LexA подвергается автопротеолизу, что активирует транскрипцию генов, необходимых для репарации ДНК. Однако в работе Schook et al. [35] в клетках *N. gonorrhoeae* был выявлен функциональный аналог LexA – белок NG1427. Предполагается, что NG1427 может участвовать в пологом на SOS-репарацию пути, отличающемся, однако, по механизму активации. Так, сигналом для начала автопротеолиза LexA является его взаимодействие с белком RecA, который формирует в клетке комплексы с одноцепочечными фрагментами ДНК [36]. Однако в случае NG1427 инактивация этого белка происходит и при отсутствии RecA [35]. Демонстрировано, что в репрессоре NG1427 под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> происходит окисление остатка С64 с образованием сульфеновой кислоты,

после чего конформация белковой молекулы меняется, и NG1427 теряет возможность связывать ДНК и, соответственно, ингибировать экспрессию генов. Schook et al. [35] предполагают, что такой механизм регуляции активности NG1427 даёт *N. gonorrhoeae* преимущество в выживании в присутствии иммунных клеток организма-хозяина.

Остановимся подробнее на системах репарации, перечисленных в табл. 2.

#### Прямое исправление повреждений в ДНК.

Эта система репарации принципиально отличается от BER, NER и MMR, так как не требует «вырезания» повреждения и синтеза ДНК *de novo*. Прямая репарация заключается в действии специфических ферментов, способных быстро в одну стадию восстановить исходную структуру ДНК. В общепринятом смысле к прямой репарации относят систему фотореактивации и системы удаления алкильных групп гетероциклических оснований (ферменты, удаляющие O<sup>4</sup>-алкилтиминозные и O<sup>6</sup>-алкилгуанинозные продукты, и AlkB).

При анализе генома *N. gonorrhoeae* показано отсутствие некоторых генов, отвечающих за прямую репарацию метилированных оснований ДНК, таких как *ada*, *alkA*, *alkB* и *aidB* [34, 37]. В работе Kline et al. [37] сообщалось о наличии гена O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы II (Ogt). Однако в более

Таблица 2. Системы репарации ДНК организма *Neisseria gonorrhoeae*

Система репарации ДНК	Ключевые ферменты, которые вовлечены в процесс репарации	Возможная причина возникновения мутации	Пример нарушения структуры ДНК
Система прямой репарации ДНК [48]	O <sup>6</sup> -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза II (Ogt)	алкилирующие агенты [49]	O <sup>4</sup> -метилтимин и O <sup>6</sup> -метилгуанин
Экцизионная репарация оснований (BER) [37]	ДНК-гликозилазы (Nth, Tag, Ung, MutM, MutY); AP-эндонуклеаза (Xth)	активные формы кислорода [50]	7,8-дигидро-8-оксогуанин [51]
Экцизионная репарация нуклеотидов (NER) [52]	UvrABCD; Mfd	химические агенты (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) [52], УФ-излучение [53]	пиримидиновые димеры [53]
Репарация неканонических пар нуклеотидов (MMR) [54]	MutS, MutL	«ошибки» ДНК-полимеразы [55]	неканонические пары нуклеотидов
Репарация очень коротких участков (VSP) [56]	Vsr-эндонуклеазы; ДНК-полимераза I; MutS, MutL	дезаминирование 5-метилцитозина [57, 58]	неканонические dG/T-пары [56]
Репарация с участием систем рекомбинации [59]	RecAXBCD; RecGORQJN; RuvABC	излучение различного типа [60], химические агенты [28]	двухцепочечные разрывы

поздней работе Ambur et al. [34] эти сведения были опровергнуты. Используя базу данных PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity), мы проверили геном *N. gonorrhoeae* FA1090 на наличие последовательности *ogt*. Обнаруженный ген кодирует белок, содержащий 48% идентичных аминокислотных остатков по сравнению с тем же из *Escherichia coli*. Для дальнейшего поиска фермента был использован сервис AlphaFold Protein Structure Database. Выяснилось, что ген *NGO\_0988* кодирует белок, который устраняет повреждения ДНК, такие как O<sup>4</sup>-метилтимин и O<sup>6</sup>-метилгуанин, возникающие при воздействии алкилирующих агентов (табл. 2). Ogt *E. coli* осуществляет прямой перенос алкильной группы модифицированного основания на остаток Cys фермента. Интересно, что белок после прохождения реакции не регенерируется, поэтому его называют «суицидальным» ферментом [38–40]. Следует, однако, отметить, что данные о функционировании Ogt в *N. gonorrhoeae* отсутствуют.

Ещё одним примером прямой репарации повреждений ДНК является ферментативная фотореактивация, которая устраняет повреждения в ДНК, появляющиеся под действием коротковолнового УФ-излучения. Примером таких повреждений являются циклобутан-пиримидиновые димеры и пиримидин-(6,4)-пиримидиновые аддукты [40]. Такие модификации в ДНК мешают нормальному прохождению процессов транскрипции и репликации, поэтому их удаление важно для выживания клетки [41–43]. Процесс фотореактивации заключается в действии ферментов фотолиаз, которые связывают ДНК в месте повреждения и восстанавливают повреждённые основания, используя энергию видимого света (300–500 нм) [44, 45]. Фотолиазы содержат восстановленную форму кофактора флавинадениндинуклеотида (FADH<sup>-</sup>), который активируется под действием света и выполняет роль донора электронов при восстановлении пиримидиновых димеров [45].

Существует мнение, что у *N. gonorrhoeae* отсутствует система фотореактивации, поскольку жизнеспособность гонококков после облучения УФ, инкубируемых как в темноте, так и при видимом свете, не отличалась [46]. Однако в геноме *N. gonorrhoeae* присутствует потенциальный гомолог ДНК-фотолиазы, кодируемый геном *phr* [37]. При этом показано, что ортолог PhrB в *N. gonorrhoeae* не участвует в процессе фотореактивации [47]. Таким образом, функции в клетке белков Phr и их участие в процессах репарации только предстоит изучить.

**Эксцизионная репарация оснований.** В ходе патогенеза клетки *N. gonorrhoeae* должны пережить атаку иммунной системы организма-хозяина. Одним из ключевых компонентов врождённого иммунного ответа является производство фагоцитами человека активных форм кислорода и азота, которые повреждают ДНК патогена [61]. Например, гидроксильные радикалы окисляют гетероциклические основания ДНК до 7,8-дигидро-8-оксогуанина или 5-гидроксицитозина [50]. Считается, что эксцизионная репарация оснований (BER) является основным механизмом восстановления таких окислительных повреждений ДНК бактерии [62].

Процесс BER может проходить тремя независимыми друг от друга путями. Первый путь предусматривает удаление повреждённого гетероциклического основания монофункциональными ДНК-гликозилазами, катализирующими гидролиз N-гликозидной связи. В результате образуется апуриновый/апиридиновый участок (AP-сайт). Определённая AP-эндонуклеаза узнаёт этот сайт и вносит одноцепочечный разрыв в ДНК с образованием 3'-гидроксильной (3'-ОН) и 5'-дезоксирибозофосфатной (5'-dRP) групп на концах. Последняя удаляется ДНК-полимеразой, обладающей dRP-лиазной активностью. Фрагмент ДНК со свободной 3'-ОН-группой является субстратом для ДНК-полимеразы, которая начинает синтез, встраивая недостающий нуклеотид (короткий путь) или несколько нуклеотидов, вытесняя цепь ДНК с dRP-фрагментом, совместно с Flap-эндонуклеазой (длинный путь). Процесс репарации завершает ДНК-лигаза, восстанавливающая целостность ДНК [40].

Другие два механизма удаления повреждённого основания ДНК связаны с функционированием бифункциональных гликозилаз семейств Nth и MutM/Frg, которые, кроме гидролиза N-гликозидной связи, также катализируют расщепление цепи в ДНК. В результате действия Nth-гликозилазы в месте разрыва на 3'-конце фрагмента ДНК образуется ненасыщенный альдегид, а в случае MutM – 3'-PO<sub>4</sub>. Обе эти группы удаляются AP-эндонуклеазами с образованием свободной 3'-ОН-группы, необходимой для функционирования ДНК-полимеразы [40].

Анализ нуклеотидных последовательностей генома *N. gonorrhoeae* выявил гены, кодирующие ферменты, потенциально вовлечённые в реализацию BER в клетках патогена (табл. 2) [37]. Известно, что присутствие 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-oxodG) может привести к ошибочному встраиванию dAMP вместо dCMP в цепь ДНК. За репарацию



подобного повреждения в клетках *E. coli* отвечают ДНК-гликозилазы MutM и MutY. MutM узнает и удаляет 8-оксогуанин, а MutY – аденин, находящийся в составе пары dA/8-oxodG [63, 64]. Относящаяся к семейству гидролаз Нудикс (Nudix) 8-oxodG-трифосфатаза MutT предотвращает включение 8-oxodGMP напротив dA в ДНК [65]. Эти три белка образуют так называемую GO-систему [66].

Davidson et al. [51] обнаружили, что функциональные домены гомологов MutM и MutY из различных микроорганизмов обладают высокой степенью консервативности. ДНК-гликозилазы MutY *E. coli* и *N. gonorrhoeae* специфично удаляют модифицированное основание из пары dA/8-oxodG [67]. Также проведены исследования системы BER в *N. meningitidis* [68, 69]. Продемонстрировано наличие ферментов MutM, MutT и MutY в клетках этой бактерии [70]. Интересно, что для *N. meningitidis*, в отличие от других бактерий, ферменты GO-системы не требуются для выживания при окислительном стрессе [68].

Кроме окислительных повреждений, белки системы BER могут участвовать в репарации алкилированных оснований в ДНК. Так, удаление 3-метиладенина реализуется ферментом AlkA (3-метиладенин-ДНК-гликозилазой II) [37]. Однако в клетках *N. gonorrhoeae* этот фермент не был обнаружен. Полагают, что его функции выполняет 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза I (Tag), ген которой был найден в геноме бактерии [37, 71].

**Экцизионная репарация нуклеотидов.** Экцизионная репарация нуклеотидов (NER) используется для узнавания и удаления многих типов окислительных повреждений ДНК или пиримидиновых димеров, продуцируемых действием УФ-излучения [52]. Анализ нуклеотидных последовательностей генома бактерии выявил гены белков, потенциально вовлечённых в процесс NER, включая ферменты UvrA, UvrB, UvrC, UvrD и Mfd [72]. Высокая степень гомологии этих ферментов в *N. gonorrhoeae* и *E. coli* свидетельствует в пользу схожих механизмов NER у этих бактерий [37]. Белковый фактор TRCF (Transcription Repair Coupling Factor или Mfd) привлекает белки системы NER для репарации повреждений ДНК. Эти белки блокируют транскрипцию до тех пор, пока не произойдёт удаление повреждения в ДНК и восстановление целостности цепи [52]. Комплекс UvrAB узнаёт и связывает повреждённую ДНК. После диссоциации UvrA белок UvrB взаимодействует с эндонуклеазой UvrC, которая вносит одноцепочечные разрывы в повреждённую цепь ДНК с двух сторон от моди-

фицированного нуклеотида. Далее, с помощью хеликазы UvrD, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы осуществляется удаление повреждённого олигонуклеотидного фрагмента, синтез комплементарного участка цепи и лигирование соответственно.

Несмотря на наличие у *N. gonorrhoeae* аналога фермента ДНК-фотолиазы, полагают, что NER является преобладающим механизмом восстановления УФ-повреждённый ДНК в клетках этого патогена. Campbell и Yasbin [53] продемонстрировали удаление пиримидиновых димеров, образованных при воздействии УФ-излучения, с помощью белков системы NER. Инактивация любого из генов *uvrABCD* приводила к повышенной чувствительности клеток *N. gonorrhoeae* к УФ-облучению или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [52].

Так как NER и BER эффективно удаляют различные повреждения ДНК патогена, способствуя его выживаемости, подавление функционирования этих систем может стать новым подходом для лечения гонореи. В частности, для узнавания повреждения белку UvrA необходимо взаимодействие с АТФ. Таким образом, разработка препаратов, направленных на ингибирование АТФазной активности UvrA, может значительно усовершенствовать существующую терапию заболевания [73].

**Система репарации «мисматчей».** Особое значение для поддержания стабильности генома *N. gonorrhoeae* имеет система репарации неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» [33]. Причиной появления «мисматчей» являются неточности в функционировании ДНК-полимеразы в процессе репликации ДНК [37]. Нарушение работы системы MMR приводит к накоплению мутаций в ДНК и генетической нестабильности [74].

Система MMR прокариот является предметом нашего пристального внимания [74–77]. Репарация в клетках *N. gonorrhoeae* начинается после узнавания неканонической пары нуклеотидов белком MutS, затем к комплексу MutS с ДНК привлекается эндонуклеаза MutL, которая вносит одноцепочечный разрыв в «дочернюю» цепь ДНК [54, 76]. Далее, хеликаза UvrD расплетает ДНК, белок SSB (от single-strand binding) связывает одноцепочечный фрагмент «материнской» цепи и защищает его от дегградации, а одноцепочечная ДНК, содержащая «мисматч», подвергается гидролизу экзонуклеазами. На последнем этапе ДНК-полимераза застраивает образовавшуюся «брешь», а лигаза восстанавливает целостность цепи ДНК.

В отличие от *E. coli*, репарация «мисматчей» у *N. gonorrhoeae* является метилнезависи-

мой ввиду отсутствия у гонококка сайт-специфической эндонуклеазы MutH, характерной лишь для ряда  $\gamma$ -протеобактерий. MutH вносит одноцепочечный разрыв («ник») в неметилированную («дочернюю») цепь монометилированного участка 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'/3'-CTAG $\downarrow$ -5' (рис. 1) [74]. Более того, функция MutL из *E. coli* заключается в координации белок-белковых взаимодействий после узнавания «мисматча» в ДНК [78]. В случае *N. gonorrhoeae* (как и большинства других организмов [77]) именно белок MutL отвечает за внесение одноцепочечного разрыва в «дочернюю» цепь с «мисматчем» [54, 79]. MutL *in vitro* является низкоэффективной эндонуклеазой и не имеет участка узнавания в ДНК, поэтому вопрос дискриминации «дочерней» цепи подобными ферментами остаётся открытым [79, 80].

Процесс репарации «мисматчей» является пострепликативным. Функционирование белков этой системы тесно связано с репликацией. MutS и MutL взаимодействуют с  $\beta$ -субъедини-

цей ДНК-полимеразы III ( $\beta$ -«зажимом») [81–83].  $\beta$ -«Зажим» не только повышает эффективность взаимодействия белков MutS и MutL с ДНК. Полагают, что за счёт образования комплекса MutL с  $\beta$ -«зажимом» происходит дискриминация «дочерней» цепи в организмах, лишённых MutH [84]. Также особая роль в этом процессе отводится «никам» в ДНК [79], что продемонстрировано для эукариотических клеток. Однако в случае прокариот эта гипотеза нуждается в подтверждении.

Рекомбинантный белок MutS из системы MMR *N. gonorrhoeae* (ngMutS) был впервые получен в 2017 г. Рентгеноструктурный анализ ngMutS (PDB-код: 5YK4) показал, что он существует в виде димера, а каждый мономер имеет в своём составе 864 а.о., молекулярную массу 95 кДа и рI 6,08 [85]. Авторы также продемонстрировали *in vitro* АТФазную активность выделенного фермента и его способность связывать ДНК с dG/T-парой. На сегодняшний день известно, что инициация системы репа-

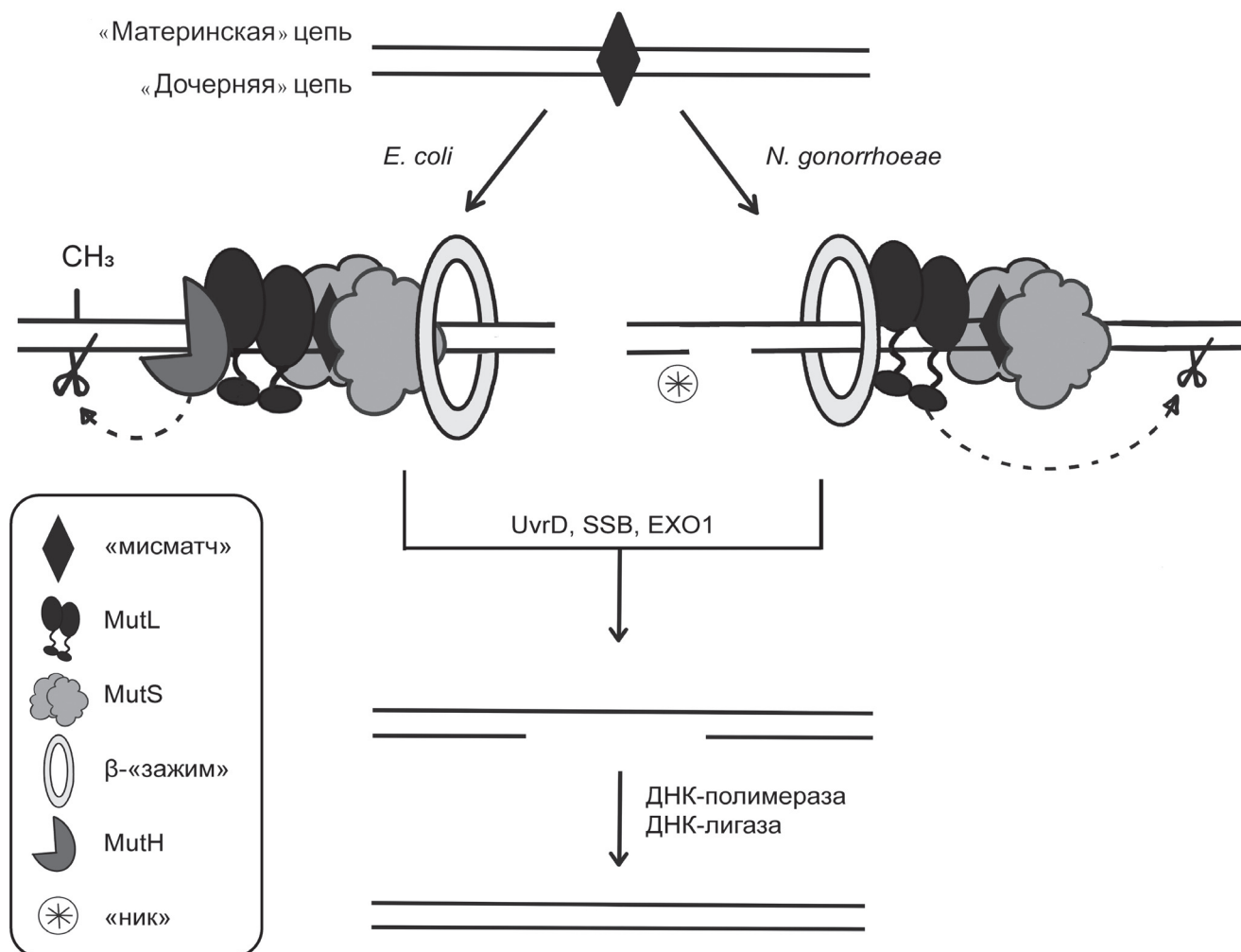


Рис. 1. Схема реализации MMR в клетках *E. coli* и *N. gonorrhoeae*. «Ник» – разрыв в одной из цепей ДНК









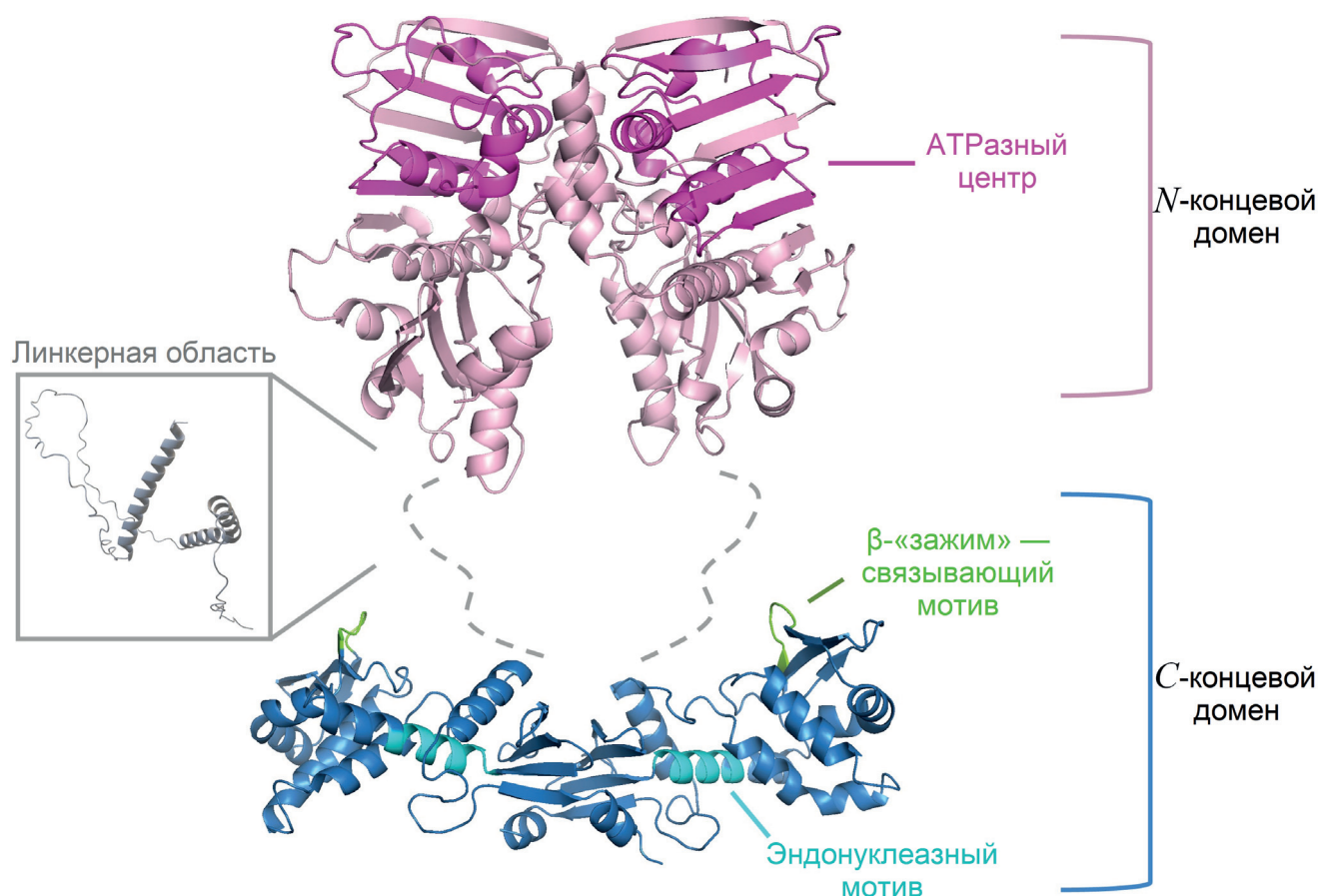


Рис. 4. Модель пространственных структур доменов и линкерного участка мономера белка MutL из *N. gonorrhoeae*

мотивы, вовлечённые в координацию ионов двухвалентных металлов и реализацию эндонуклеазной функции фермента (рис. 3) [74].

Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов MutL выявило наличие консервативного мотива QHLLIP (рис. 3) в C-концевом домене белка ngMutL, ответственного за связывание с β-«зажимом» [74, 90]. Исходя из этого, можно предположить механизм внесения одноцепочечного разрыва в повреждённую цепь ДНК белком MutL в ходе процесса репарации «мисматчей» организма *N. gonorrhoeae* (рис. 1). Однако прокариотические MutL мало изучены, и детали о влиянии различных факторов на специфичное внесение одноцепочечного разрыва до сих пор уточняются.

#### Система репарации очень коротких участков.

5-Метилцитозин, образование которого катализируется цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами, является эпигенетическим маркером, позволяющим различать собственную и чужеродную ДНК и регулировать экспрессию генов [91]. Однако, будучи менее стабильным, чем неметилированный цитозин, 5-метилцитозин легко подвергается спонтанному де-

заминированию с образованием тимина [57, 58]. В результате этого процесса образуется повреждение ДНК, представляющее собой неканоническую пару dG/T, за исправление которого отвечает система репарации VSP [92]. Ключевыми ферментами данной системы являются высокоспецифичные эндонуклеазы Vsr и ДНК-полимераза I. Эндонуклеаза Vsr узнаёт неканоническую пару dG/T и вносит одноцепочечный разрыв с 5'-конца от тимидина [93]. ДНК-полимераза I, обладающая 5'→3'-экзонуклеазной и полимеразной активностями, восстанавливает каноническую dG/dC-пару.

Kwiatek et al. [92] идентифицировали два гена *N. gonorrhoeae*, кодирующие эндонуклеазы Vsr (V.ngAXIII и V.ngAXIV), которые имеют высокую специфичность к парам dG/T в составе ДНК. Есть предположение, что белки ngMutS и ngMutL в системе репарации очень коротких участков регулируют гидролитическую активность эндонуклеаз Vsr [94]. Выявлено взаимодействие между ngMutL и обеими эндонуклеазами Vsr патогена [56]. Более того, в присутствии ngMutL эффективность специфичного гидролиза ДНК эндонуклеазами V.ngAXIII и V.ngAXIV увеличивалась. Вместе

с тем образования комплекса между белком ngMutS и эндонуклеазами Vsr обнаружено не было. Присутствие ngMutS понижало эффективность гидролитической активности ферментов V.ngAXIII и V.ngAXIV. Авторы предположили, что подобный эффект наблюдается из-за того, что сродство белка ngMutS к ДНК, содержащей неканоническую dG/T-пару, гораздо выше, чем сродство белков V.ngAXIII и V.ngAXIV. Однако совместное присутствие ngMutL и ngMutS повышало эффективность специфического расщепления ДНК обеими Vsr-эндонуклеазами из *N. gonorrhoeae* по сравнению с реакцией, катализируемой только V.ngAXIII или V.ngAXIV. Таким образом, белки ngMutS и ngMutL регулируют процесс VSP-репарации, но механизм этого процесса остаётся невыясненным.

#### Репарация с участием систем рекомбинации.

Наиболее изученной системой репарации ДНК у *N. gonorrhoeae* является система рекомбинационной репарации [95]. Восстановление повреждений ДНК с помощью этого механизма может протекать по пути RecBCD, а также по RecF-подобному пути. Геном *N. gonorrhoeae* содержит гены, кодирующие белки пути RecBCD (белки RecB, RecC и RecD), благодаря которому устраняются двуцепочечные разрывы, индуцируемые излучением различного типа, действием химических веществ или возникающие в процессе репликации ДНК с одноцепочечными разрывами (последнее наиболее вероятно для данного организма) [28, 96]. Как и другие бактериальные гомологи, комплекс RecBCD из *N. gonorrhoeae* иницирует рекомбинацию, связываясь с «тупым» концом повреждённой ДНК [97]. Субъединицы RecB и RecD являются хеликазами и расплетают ДНК до определённой последовательности, называемой Chi-сайтом (5'-GCTGGTGG-3'). Далее, эндонуклеаза RecB вносит одноцепочечный разрыв в цепь ДНК, содержащую Chi-сайт, и продолжает расплетать двойную спираль. Комплекс ферментов RecBCD привлекает рекомбиназу RecA на образовавшийся 3'-конец одноцепочечной ДНК, затем RecBCD распадается. Одноцепочечный фрагмент ДНК в комплексе с RecA связывается с гомологичной последовательностью, а вторая цепь ДНК-дуплекса вытесняется с образованием структуры Холидея [98]. Разрушение этой структуры происходит с помощью белков RuvABC и RecG, гены которых также обнаружены в геноме *N. gonorrhoeae* [37, 99].

Известно, что дефекты в последовательности гена *recB* (но не *recD*) гонококков приводят к нарушению репарации двуцепочечных

разрывов ДНК, вызванных ионизирующим излучением [60]. Stohl и Seifert [28] показали, что выживаемость клеток *N. gonorrhoeae*, содержащих делеции генов *ruvA*, *ruvC* и *recG*, после воздействия на них H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> была резко снижена по сравнению с клетками исходного дикого типа.

Независимо от активности комплекса RecBCD, гомологичная рекомбинация *N. gonorrhoeae* может происходить по так называемому RecF-подобному пути, в котором участвуют хеликаза RecQ, эндонуклеаза RecJ и белки RecO и RecR. Последние привлекают рекомбиназу RecA на одноцепочечный фрагмент репарируемой ДНК [100]. Интересным отличием от RecF-пути *E. coli* в данном случае является то, что последний реализуется только в случае инактивации комплекса RecBCD в результате тех или иных мутаций [37].

### РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ПАТОГЕНЕЗЕ

**Участие рекомбинационной репарации в варибельности пилина.** Известно, что процессы рекомбинации используются *N. gonorrhoeae* не только для устранения повреждений в ДНК, но и для реализации антигенной вариации белка пилина (PilE) [101]. Ген *pilE* и кодируемый им белок можно разделить на варибельные и консервативные области [102]. Процесс антигенной вариации пилей заключается в переносе варибельной кодирующей последовательности из неэкспрессируемого «молчащего» локуса (*pilS*) в локус экспрессии (*pilE*) без изменения донорского локуса [103]. Последовательности *pilS* не имеют промотора, но высокогомологичны с экспрессируемой последовательностью *pilE*, являясь источником варибельной генетической информации. Такая изменчивость может обеспечить патогену *N. gonorrhoeae* способность сохраняться в организме хозяина продолжительное время и повторно его инфицировать [104].

Механизм антигенной вариации пилина *N. gonorrhoeae* активно изучается. Известно, что в его реализации задействованы рекомбиназа RecA, ферменты RecF-подобного пути рекомбинации (RecOR, RecJ, RecQ), а также комплекс белков RuvABC и RuvG для разрушения структуры Холидея [105]. Показано, что в результате делеций генов *recA*, *recO* и *recR* мутантные клеточные линии *N. gonorrhoeae* полностью теряли способность к антигенной вариации [101]. Нокауты генов *ruvA*, *ruvB*, *ruvC*, *recQ* или *recG* приводили к резко сниженной частоте этого процесса [106]. Тем не менее



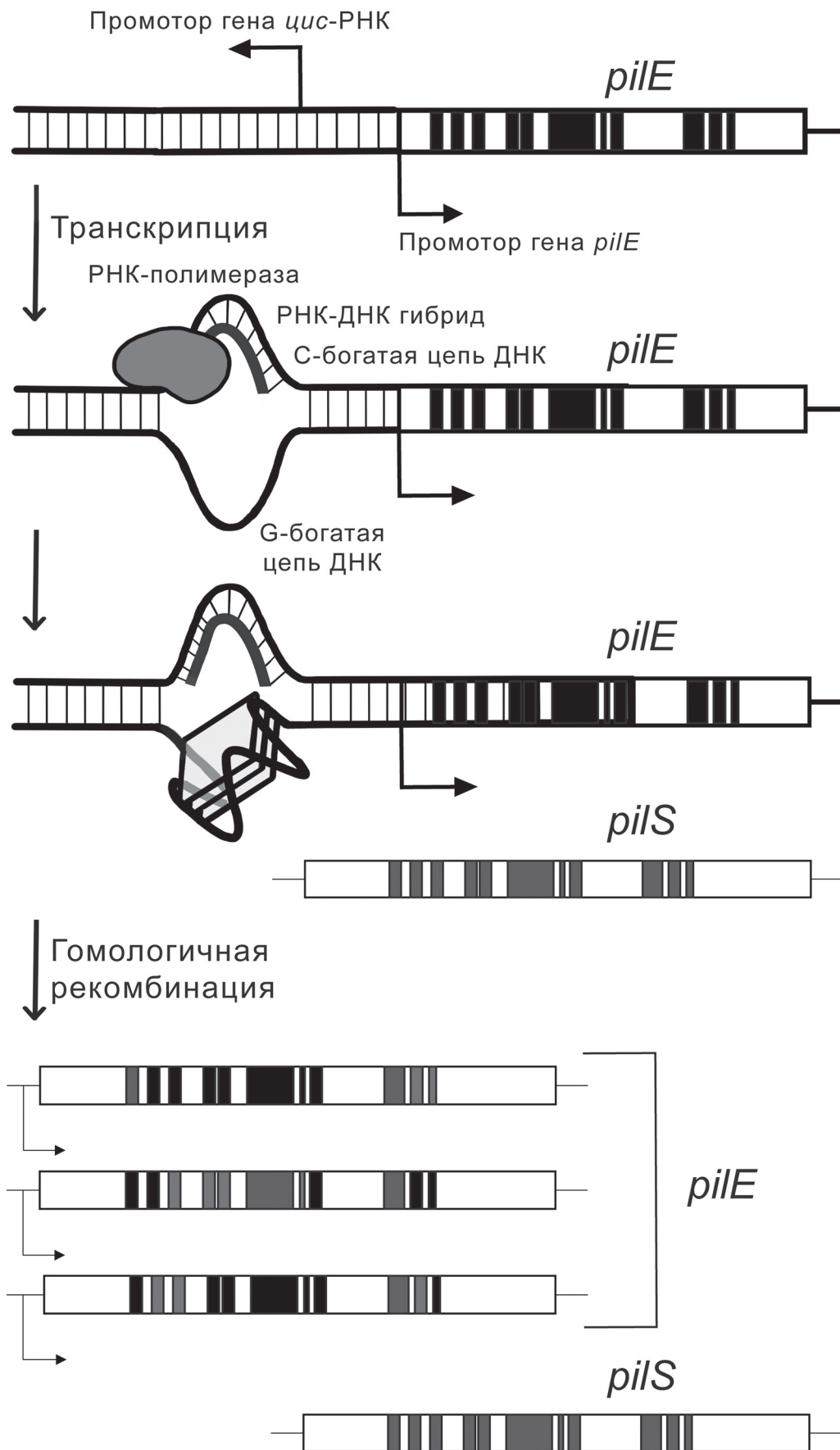


Рис. 5. Формирование параллельного G-квадруплекса для инициации антигенной вариации *pilE* патогена *N. gonorrhoeae*. Гибридизация С-богатой последовательности ДНК с комплементарной *цис*-РНК стабилизирует структуру G4

штаммы с инактивированными *recB* и *recD* демонстрировали ту же способность к вариации пилина, что и штаммы дикого типа [107]. Это свидетельствует в пользу того, что антигенная вариация пилей организма *N. gonorrhoeae* обусловлена гомологичной RecF-подобной рекомбинацией и не зависит от активности комплекса RecBCD [59, 108].

Помимо этого, для реализации процесса антигенной вариации пилей IV-го типа *N. gonorrhoeae* необходимо наличие короткой богатой гуанином последовательности, расположенной на расстоянии около 350 п.н. «выше» промотора *pilE* [109]. Эта последовательность способна образовывать параллельный G-квадруплекс (G4) *in vitro* (рис. 5) [110]. Точечные замены G (но не T [111]) в этой последовательности приводят к разрушению G4-ДНК и нарушению способности патогена к антигенной вариации пилина [95]. Полагают, что небольшая некодирующая РНК (*цис*-РНК), промотор которой располагается рядом с указанным мотивом G4 гена *pilE* и является консервативным в большинстве секвенированных штаммов *N. gonorrhoeae*, образует гибрид с C-богатой комплементарной последовательностью ДНК. Это, в свою очередь, способствует формированию G4 в противоположной цепи (рис. 5) [112, 113], поэтому для инициации антигенной вариации пилина необходима также транскрипция этой *цис*-РНК [114].

Формирование G4 *in vitro* было показано для многих G-богатых последовательностей ДНК. G-квадруплексы играют важную роль в регуляции большого числа биологических процессов, в том числе и систем репарации ДНК [115, 116]. Для *N. gonorrhoeae* было продемонстрировано, что формирование параллельного G-квадруплекса сопровождается возникновением одноцепочечных разрывов, благодаря которым происходит дальнейшая антигенная вариация пилина путём гомологичной рекомбинации. Тем не менее на сегодняшний день неизвестно, какой именно фермент вносит эти разрывы в ДНК. Присутствие низкомолекулярного соединения N-метил-мезопорфирина (NMM), специфически связывающего G4, резко снижает частоту антигенной вариации пилина *N. gonorrhoeae* [110]. Предполагают, что NMM ингибирует возникновение разрывов рядом с G-богатой областью в результате конкуренции с белками RecF-подобного пути рекомбинации за взаимодействие с G4-ДНК.

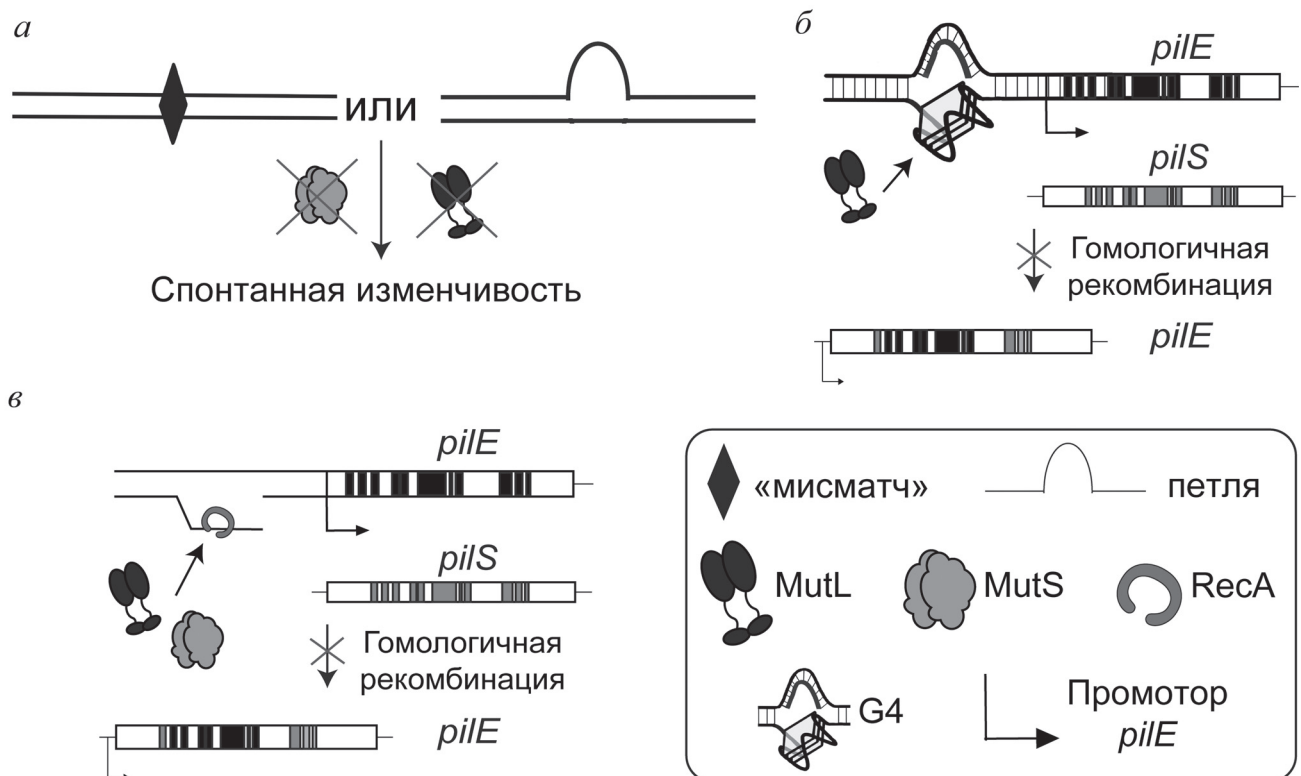
Из общих представлений о процессе гомологичной рекомбинации понятно, что после возникновения одноцепочечного разрыва в ДНК необходимо раскручивание как G4, так

и участка дуплекса вблизи неканонической структуры. Известно, что такой активностью обладает хеликаза RecQ, нокаут гена которой приводит к снижению частоты антигенной вариации в клетках *N. gonorrhoeae* [117]. Однако в результате точечной замены D307A в хеликазном мотиве RecQ, инактивирующей способность белка расплетать G4, но не ДНК-дуплекс, снижение частоты антигенной вариации в клетках патогена обнаружено не было. Таким образом, в раскручивании G4 после инициации рекомбинации RecQ не участвует, но, по всей видимости, облегчает этот процесс за счёт расплетания ДНК-дуплекса вблизи G-богатой последовательности [117].

**Влияние систем NER и BER на выживаемость и изменчивость *N. gonorrhoeae*.** Как было описано выше (см. «Экцизионная репарация оснований» и «Экцизионная репарация нуклеотидов»), пути NER и BER *N. gonorrhoeae* служат преимущественно для устранения повреждений, вызванных различными экзогенными факторами. Эти важнейшие механизмы позволяют патогену выживать в среде организма-хозяина [118].

Кроме своей основной роли, белки NER вносят вклад в изменчивость пилина. Несмотря на то что они не вовлечены в антигенную вариацию *pilE*, показано, что нокаут *uvrD* (но не *uvrABC*) значительным образом увеличивает вариацию белка PilC, входящего в состав пилей IV-го типа [119]. Структурный белок PilC претерпевает фазовые вариации, однако по RecA-независимому пути. В *N. gonorrhoeae* присутствуют два идентичных гена *pilC1* и *pilC2*, которые способны «переключаться» между собой за счёт сдвига рамки считывания в областях, кодирующих сигнальный пептид [120, 121].

**Влияние белков MMR на адаптацию патогена.** В настоящее время в литературе появляются новые данные о влиянии белков системы MMR на различные процессы адаптации и изменчивости *N. gonorrhoeae* и его родственного вида *N. meningitidis*, системы репарации ДНК которых аналогичны, как и процессы фазовой и антигенной вариации [122, 123]. Так, продемонстрировано, что снижение активности белков MMR способствует видовой изменчивости и адаптации бактерий к условиям окружающей среды (рис. 6, а) [123]. Richardson и Stojiljkovic [124] показали, что нокауты генов *mutS* или *mutL* в клинических штаммах *N. meningitidis* привели к резкому увеличению частоты появления спонтанной мутации устойчивости к рифампицину. Также описана природная клеточная линия, экспрессирующая ген мутантной формы белка MutL (32 аминокислотные замены по срав-



**Рис. 6.** Возможные пути влияния системы MMR на патогенез *N. gonorrhoeae*. *а* — Инактивация MMR приводит к накоплению мутаций и повышенной изменчивости бактерий. *б* — Связывание ngMutL с G4 перед промотором пилина блокирует инициацию антигенной вариации, что препятствует изменчивости патогена. *в* — ngMutL и ngMutS инактивируют действие RecA, снижая эффективность антигенной вариации пилина

нению с ферментом дикого типа), которая обладает высокой частотой фазовых вариаций и быстро приобретает устойчивость к этому антибиотику. Изолированные клетки *N. meningitidis*, вырабатывающие мутантную форму MutS, также показывали высокую скорость изменчивости по данному признаку.

Показано влияние белков MMR на вариацию поверхностного белка PorA. Штамм *N. meningitidis*, лишённый белка MutS, демонстрировал снижение экспрессии гена, кодирующего PorA. Это позволило патогену выработать устойчивость к антибактериальной активности PorA-специфического моноклонального антитела, являющегося основным компонентом ряда вакцин, снижая их эффективность [125].

По некоторым данным, белки системы MMR *N. gonorrhoeae* могут принимать участие в регуляции гомологичной рекомбинации *pilE/pilS*, лежащей в основе антигенной вариации пилина [119]. Мутантные линии патогена с нокаутами генов *mutS* или *mutL* (см. «Система репарации «мисматчей») демонстрируют повышенную частоту антигенной вариации *pilE* [126]. Установлено, что белок MutS обладает высоким сродством к G4-структурам [127–129]. Предполагалось, что именно за счёт этого свойства он регулирует гомологичную рекомбинацию, так

как образование G4 необходимо для протекания этого процесса (см. «Участие рекомбинационной репарации в варибельности пилина»). Однако клеточные линии *N. gonorrhoeae*, содержащие как делецию гена *mutS*, так и ген мутантного MutS, способный связывать только G-квадруплексы, демонстрировали одинаково повышенную антигенную вариацию пилина [126]. Подобный эксперимент для MutL не проводили, тем не менее нами также продемонстрирована способность этого белка связывать G4-структуры [127]. Можно предположить, что процесс гомологичной рекомбинации *N. gonorrhoeae* регулируется благодаря этому свойству MutL (рис. 6, б).

Показано, что MutL стимулирует G4-хеликазную активность UvrD [121, 130]. Однако предположение о том, что UvrD задействована в регуляции антигенной вариации *pilE*, опровергается экспериментальными данными (нокаут гена хеликазы не влияет на изменчивость этого белка) [119].

Один из предполагаемых механизмов влияния белков MMR на антигенную вариацию пилина заключается в их взаимодействии с рекомбиназой RecA. Так, для клеток *E. coli* продемонстрировано, что комплекс MutS–MutL ингибирует рекомбиназу RecA *in vitro* и тем

самым может регулировать гомологичную рекомбинацию [131] (рис. 6, в). В целом, процесс регуляции антигенной вариации *pilE* белками системы MMR патогена *N. gonorrhoeae* остается неясным.

Влияние MMR на изменчивость пилина не ограничивается антигенной вариацией *pilE*. Известно, что инактивация MutS и MutL *N. gonorrhoeae*, как и нокаут гена хеликазы (*uvrD*), повышает вариацию PilC по независимому от RecA механизму [119]. Предполагается, что эта изменчивость PilC является результатом отсутствия репарации «мисматчей» и небольших петель в генах *pilC1* и *pilC2*, возникающих при репликации (рис. 6, а).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что бактерия *N. gonorrhoeae* известна на протяжении многих лет, механизмы её адаптации к различным условиям обитания (в том числе и антибиотикам), остаются неизученными. Большой вклад в вирулентность бактерии вносят различные системы репарации ДНК, отвечающие как за устранение повреждений и «ошибок» в ДНК (сохранение генетической информации), так и за изменчивость белков внешней мембраны патогена. Наиболее активно на сегодняшний день изучают белки систем репарации очень коротких участков (VSP), рекомбинационной репарации и репарации «мисматчей» (MMR), в частности, исследуемый в наших работах ngMutL.

Особую роль в выживаемости *N. gonorrhoeae* играет система MMR. Так, штаммы с инактивиро-

ванными белками системы MMR демонстрируют повышенную изменчивость, устойчивость к антибиотикам и адгезивность к клеткам человека. Предполагается, что ngMutS и ngMutL, помимо своей основной роли в репарации неканонических пар оснований, вовлечены в регуляцию процесса антигенной вариации пилей IV-го типа, детали которого ещё предстоит изучить. Понимание функционирования систем репараций ДНК патогена может позволить разработать новые подходы к созданию препаратов, позволяющих бороться с заболеванием, вызываемым *N. gonorrhoeae*, что является актуальным в силу растущего числа устойчивых к антибиотикам штаммов этого патогена.

**Вклад авторов.** В.Ю. Савицкая, М.В. Монахова и Е.А. Кубарева – концепция; В.Ю. Савицкая, И.И. Боровикова и Ю.В. Якушкина – анализ литературы; В.Ю. Савицкая, М.В. Монахова и Е.А. Кубарева – обсуждение данных литературы; В.Ю. Савицкая – подготовка текста; В.Ю. Савицкая, И.И. Боровикова, Ю.В. Якушкина, и М.В. Монахова – подготовка иллюстративного материала, Е.А. Кубарева и М.В. Монахова – редактирование обзора.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00161).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoffman, O., and Weber, J. R. (2009) Review: Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis, *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, **2**, 401-412, doi: 10.1177/1756285609337975.
- Snyder, L. A. S., Butcher, S. A., and Saunders, N. J. (2001) Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp, *Microbiology*, **147**, 2321-2332, doi: 10.1099/00221287-147-8-2321.
- Hill, S. A., Masters, T. L., and Wachter, J. (2016) Gonorrhoea – an evolving disease of the new millennium, *Microb. Cell*, **3**, 371-389, doi: 10.15698/mic2016.09.524.
- Caromona-Gutierrez, D., Kainz, K., and Madeo, F. (2016) Sexually transmitted infections: old foes on the rise, *Microb. Cell*, **3**, 361-362, doi: 10.15698/mic2016.09.522.
- Lim, K. Y. L., Mullally, C. A., Haese, E. C., Kibble, E. A., McCluskey, N. R., et al. (2021) Anti-virulence therapeutic approaches for *Neisseria gonorrhoeae*, *Antibiotics*, **10**, 103, doi: 10.3390/antibiotics10020103.
- Liu, J., Yang, C., Cheng, C., Zhang, C., Zhao, J., and Fu, C. (2021) *In vitro* antimicrobial effect and mechanism of action of plasma-activated liquid on planktonic *Neisseria gonorrhoeae*, *Bioengineered*, **12**, 4605-4619, doi: 10.1080/21655979.2021.1955548.
- Dijokaite, A., Humbert, M. V., Borkowski, E., La Ragione, R. M., and Christodoulides, M. (2021) Establishing an invertebrate *Galleria mellonella* greater wax moth larval model of *Neisseria gonorrhoeae* infection, *Virulence*, **12**, 1900-1920, doi: 10.1080/21505594.2021.1950269.
- Quillin, S. J., and Seifert, H. S. (2018) *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogene-



- sis, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 226-240, doi: 10.1038/nrmicro.2017.169.
9. Giltner, C. L., Nguyen, Y., and Burrows, L. L. (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 740-772, doi: 10.1128/MMBR.00035-12.
  10. Rudel, T., Scheuerpflug, I., and Meyer, T. F. (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin, *Nature*, **373**, 357-359, doi: 10.1038/373357a0.
  11. Denis, K., Le Bris, M., Le Guennec, L., Barnier, J.-P., Faure, C., et al. (2019) Targeting type IV pili as an antivirulence strategy against invasive meningococcal disease, *Nat. Microbiol.*, **4**, 972-984, doi: 10.1038/s41564-019-0395-8.
  12. Plant, L. J., and Jonsson, A.-B. (2006) Type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* influence the activation of human CD4<sup>+</sup> T cells, *Infect. Immun.*, **74**, 442-448, doi: 10.1128/IAI.74.1.442-448.2006.
  13. Shaughnessy, J., Ram, S., and Rice, P. A. (2019) Biology of the gonococcus: disease and pathogenesis, *Methods in Molecular Biology*, Springer, Totowa, NJ.
  14. Zhang, S., Tu, Y., Cai, H., Ding, H., Li, Q., et al. (2016) Opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* in lipooligosaccharide mutants lost ability to interact with neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d), *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, **36**, 344-349, doi: 10.1007/s11596-016-1589-4.
  15. Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Sparling, P. F. (1985) Gonococcal infection: a model of molecular pathogenesis, *N. Engl. J. Med.*, **312**, 1683-1694, doi: 10.1056/NEJM198506273122606.
  16. Judd, R. C. (1989) Protein I: structure, function, and genetics, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, S41-S48, doi: 10.1128/CMR.2.Suppl.S41-S48.1989.
  17. Ram, S., McQuillen, D. P., Gulati, S., Elkins, C., Pangburn, M. K., et al. (1998) Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Exp. Med.*, **188**, 671-680, doi: 10.1084/jem.188.4.671.
  18. Ram, S., Cullinane, M., Blom, A. M., Gulati, S., McQuillen, D. P., et al. (2001) Binding of C4b-binding protein to porin, *J. Exp. Med.*, **193**, 281-296, doi: 10.1084/jem.193.3.281.
  19. Song, W., Ma, L., Chen, R., and Stein, D. C. (2000) Role of lipooligosaccharide in Opa-independent invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells, *J. Exp. Med.*, **191**, 949-960, doi: 10.1084/jem.191.6.949.
  20. Chakraborti, S., Gulati, S., Zheng, B., Beurskens, F. J., Schuurman, J., et al. (2020) Bypassing phase variation of lipooligosaccharide (LOS): using heptose 1 glycan mutants to establish widespread efficacy of gonococcal anti-LOS monoclonal antibody 2C7, *Infect. Immun.*, **88**, e00862-19, doi: 10.1128/IAI.00862-19.
  21. Schaub, R. E., Perez-Medina, K. M., Hackett, K. T., Garcia, D. L., and Dillard, J. P. (2019) *Neisseria gonorrhoeae* PBP3 and PBP4 facilitate NOD1 agonist peptidoglycan fragment release and survival in stationary phase, *Infect. Immun.*, **87**, e00833-18, doi: 10.1128/IAI.00833-18.
  22. Schaub, R. E., and Dillard, J. P. (2019) The pathogenic *Neisseria* use a streamlined set of peptidoglycan degradation proteins for peptidoglycan remodeling, recycling, and toxic fragment release, *Front. Microbiol.*, **10**, 73, doi: 10.3389/fmicb.2019.00073.
  23. Wetzler, L. M., Barry, K., Blake, M. S., and Gotschlich, E. C. (1992) Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera, *Infect. Immun.*, **60**, 39-43, doi: 10.1128/iai.60.1.39-43.1992.
  24. Ngampasutadol, J., Ram, S., Gulati, S., Agarwal, S., Li, C., et al. (2008) Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion, *J. Immunol.*, **180**, 3426-3435, doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3426.
  25. Edwards, J. L., and Apicella, M. A. (2002) The role of lipooligosaccharide in *Neisseria gonorrhoeae* pathogenesis of cervical epithelia: lipid A serves as a C3 acceptor molecule, *Cell. Microbiol.*, **4**, 585-598, doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00212.x.
  26. Heesterbeek, D. A. C., Muts, R. M., van Hensbergen, V. P., de Saint Aulaire, P., Wennekes, T., et al. (2021) Outer membrane permeabilization by the membrane attack complex sensitizes Gram-negative bacteria to antimicrobial proteins in serum and phagocytes, *PLOS Pathog.*, **17**, e1009227, doi: 10.1371/journal.ppat.1009227.
  27. Johnson, S. R., Steiner, B. M., Cruce, D. D., Perkins, G. H., and Arko, R. J. (1993) Characterization of a catalase-deficient strain of *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for the significance of catalase in the biology of *N. gonorrhoeae*, *Infect. Immun.*, **61**, 1232-1238, doi: 10.1128/iai.61.4.1232-1238.1993.
  28. Stohl, E. A., and Seifert, H. S. (2006) *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide, *J. Bacteriol.*, **188**, 7645-7651, doi: 10.1128/JB.00801-06.
  29. Skaar, E. P., Tobiasson, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., et al. (2002) The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10108-10113, doi: 10.1073/pnas.152334799.
  30. Tseng, H.-J., Srikhanta, Y., McEwan, A. G., and Jennings, M. P. (2001) Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity, *Mol. Microbiol.*, **40**, 1175-1186, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02460.x.

31. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P. L. (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms, *Chem. Rev.*, **106**, 302-323, doi: 10.1021/cr0404794.
32. Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**, 235-263, doi: 10.1002/em.22087.
33. Black, C. G., Fyfe, J. A. M., and Davies, J. K. (1998) Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*, *Gene*, **208**, 61-66, doi: 10.1016/S0378-1119(97)00653-7.
34. Ambur, O. H., Davidsen, T., Frye, S. A., Balasingham, S. V., Lagesen, K., et al. (2009) Genome dynamics in major bacterial pathogens, *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 453-470, doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00173.x.
35. Schook, P. O. P., Stohl, E. A., Criss, A. K., and Seifert, H. S. (2011) The DNA-binding activity of the *Neisseria gonorrhoeae* LexA orthologue NG1427 is modulated by oxidation, *Mol. Microbiol.*, **79**, 846-860, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07491.x.
36. Masłowska, K. H., Makiela-Dzubska, K., and Fijałkowska, I. J. (2019) The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage, *Environ. Mol. Mutagen.*, **60**, 368-384, doi: 10.1002/em.22267.
37. Kline, K. A., Sechman, E. V., Skaar, E. P., and Seifert, H. S. (2003) Recombination, repair and replication in the pathogenic *Neisseriae*: the 3 R's of molecular genetics of two human-specific bacterial pathogens, *Mol. Microbiol.*, **50**, 3-13, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03679.x.
38. Lindahl, T. (1981) DNA methyl transferase acting on O<sup>6</sup>-methylguanine residues in adapted *E. coli*, *Chromosome Damage and Repair*, Springer US, New York, NY.
39. Lindahl, T., Demple, B., and Robins, P. (1982) Suicide inactivation of the *E. coli* O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, *EMBO J.*, **1**, 1359-1363, doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01323.x.
40. Friedberg, E. C., and Walker, G. C. (2006) *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Second Edition, Washington, DC.
41. Setlow, R. B., Swenson, P. A., and Carrier, W. L. (1963) Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells, *Science*, **142**, 1464-1466, doi: 10.1126/science.142.3598.1464.
42. Swenson, P. A., and Setlow, R. B. (1966) Effects of ultraviolet radiation on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **15**, 201-219, doi: 10.1016/S0022-2836(66)80221-8.
43. Villani, G., Boiteux, S., and Radman, M. (1978) Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: extent and fidelity of in vitro DNA synthesis on irradiated templates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3037-3041, doi: 10.1073/pnas.75.7.3037.
44. Yamamoto, J., Shimizu, K., Kanda, T., Hosokawa, Y., Iwai, S., et al. (2017) Loss of fourth electron-transferring tryptophan in animal (6-4) photolyase impairs DNA repair activity in bacterial cells, *Biochemistry*, **56**, 5356-5364, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00366.
45. Thiagarajan, V., Byrdin, M., Eker, A. P. M., Müller, P., and Brettel, K. (2011) Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9402-9407, doi: 10.1073/pnas.1101026108.
46. Campbell, L. A., and Yasbin, R. E. (1979) Deoxyribonucleic acid repair capacities of *Neisseria gonorrhoeae*: absence of photoreactivation, *J. Bacteriol.*, **140**, 1109-1111, doi: 10.1128/jb.140.3.1109-1111.1979.
47. Cahoon, L. A., Stohl, E. A., and Seifert, H. S. (2011) The *Neisseria gonorrhoeae* photolyase orthologue phrB is required for proper DNA supercoiling but does not function in photo-reactivation, *Mol. Microbiol.*, **79**, 729-742, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07481.x.
48. Couvé, S., Ishchenko, A. A., Fedorova, O. S., Ramanculov, E. M., Laval, J., et al. (2013) Direct DNA lesion reversal and excision repair in *Escherichia coli*, *EcoSal Plus*, **5**, doi: 10.1128/ecosalplus.7.2.4.
49. Rydberg, B., and Lindahl, T. (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction, *EMBO J.*, **1**, 211-216, doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01149.x.
50. Cadet, J., and Wagner, J. R. (2013) DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a012559, doi: 10.1101/cshperspect.a012559.
51. Davidsen, T., Bjørås, M., Seeberg, E. C., and Tønjum, T. (2005) Antimutator role of DNA glycosylase MutY in pathogenic *Neisseria* species, *J. Bacteriol.*, **187**, 2801-2809, doi: 10.1128/JB.187.8.2801-2809.2005.
52. LeCuyer, B. E., Criss, A. K., and Seifert, H. S. (2010) Genetic characterization of the nucleotide excision repair system of *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Bacteriol.*, **192**, 665-673, doi: 10.1128/JB.01018-09.
53. Campbell, L. A., and Yasbin, R. E. (1984) A DNA excision repair system for *Neisseria gonorrhoeae*, *Mol. Gen. Genet. MGG*, **193**, 561-563, doi: 10.1007/BF00382101.
54. Duppatla, V., Bodda, C., Urbanke, C., Friedhoff, P., and Rao, D. N. (2009) The C-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of *Neisseria gonorrhoeae* MutL, *Biochem. J.*, **423**, 265-277, doi: 10.1042/BJ20090626.
55. Kunkel, T. A. (2004) DNA replication fidelity, *J. Biol. Chem.*, **279**, 16895-16898, doi: 10.1074/jbc.R400006200.
56. Adamczyk-Popławska, M., Bandyra, K., and Kwiatek, A. (2018) Activity of Vsr endonucleases encoded by *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 is influenced by MutL and MutS proteins, *BMC Microbiol.*, **18**, 95, doi: 10.1186/s12866-018-1243-3.
57. Ehrlich, M., Norris, K. F., Wang, R. Y., Kuo, K. C., and Gehrke, C. W. (1986) DNA cytosine methylation

- and heat-induced deamination, *Biosci. Rep.*, **6**, 387-393, doi: 10.1007/BF01116426.
58. Shen, J.-C., Rideout, W. M., and Jones, P. A. (1994) The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 972-976, doi: 10.1093/nar/22.6.972.
59. Prister, L. L., Xu, J., and Seifert, H. S. (2019) A double-strand break does not promote *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, *J. Bacteriol.*, **201**, e00256-19, doi: 10.1128/JB.00256-19.
60. Salvatore, P., Bucci, C., Pagliarulo, C., Tredici, M., Colicchio, R., et al. (2002) Phenotypes of a naturally defective recB allele in *Neisseria meningitidis* clinical isolates, *Infect. Immun.*, **70**, 4185-4195, doi: 10.1128/IAI.70.8.4185-4195.2002.
61. Fang, F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 820-832, doi: 10.1038/nrmicro1004.
62. Van der Veen, S., and Tang, C. M. (2015) The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 83-94, doi: 10.1038/nrmicro3391.
63. Bignon, E., Gillet, N., Chan, C.-H., Jiang, T., Monari, A., et al. (2021) Recognition of a tandem lesion by DNA bacterial formamidopyrimidine glycosylases explored combining molecular dynamics and machine learning, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 2861-2869, doi: 10.1016/j.csbj.2021.04.055.
64. Tsai-Wu, J. J., Liu, H. F., and Lu, A. L. (1992) *Escherichia coli* MutY protein has both N-glycosylase and apurinic/aprimidinic endonuclease activities on A.C and A.G mispairs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8779-8783, doi: 10.1073/pnas.89.18.8779.
65. Nakamura, T., Meshitsuka, S., Kitagawa, S., Abe, N., Yamada, J., et al. (2010) Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base, *J. Biol. Chem.*, **285**, 444-452, doi: 10.1074/jbc.M109.066373.
66. Ендуткин, А. В., Жарков, Д. О. (2021) ГО-система: путь репарации ДНК для борьбы с окислительными повреждениями, *Мол. Биол.*, **55**, 223-242, doi: 10.31857/S0026898421020063.
67. Fromme, J. C., Banerjee, A., Huang, S. J., and Verdine, G. L. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase, *Nature*, **427**, 652-656, doi: 10.1038/nature02306.
68. Nagorska, K., Silhan, J., Li, Y., Pelicic, V., Freemont, P. S., et al. (2012) A network of enzymes involved in repair of oxidative DNA damage in *Neisseria meningitidis*, *Mol. Microbiol.*, **83**, 1064-1079, doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07989.x.
69. Davidsen, T., Amundsen, E. K., Rødland, E. A., and Tønjum, T. (2007) DNA repair profiles of disease-associated isolates of *Neisseria meningitidis*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **49**, 243-251, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00195.x.
70. Landová, B., and Šilhán, J. (2020) Conformational changes of DNA repair glycosylase MutM triggered by DNA binding, *FEBS Lett.*, **594**, 3032-3044, doi: 10.1002/1873-3468.13876.
71. Michelson, A. Z., Chen, M., Wang, K., and Lee, J. K. (2012) Gas-phase studies of purine 3-methyladenine DNA glycosylase II (AlkA) substrates, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9622-9633, doi: 10.1021/ja211960r.
72. Van Houten, B., Croteau, D. L., DellaVecchia, M. J., Wang, H., and Kisker, C. (2005) 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, **577**, 92-117, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.013.
73. Bernacchia, L., Paris, A., Gupta, A., Moores, A. A., and Kad, N. M. (2022) Identification of the target and mode of action for the prokaryotic nucleotide excision repair inhibitor ATBC, *Biosci. Rep.*, **42**, BSR20220403, doi: 10.1042/BSR20220403.
74. Монахова М. В., Милакина М. А., Трикин Р. М., Орецкая Т. С., Кубарева Е. А. (2020) Особенности функционирования белка MutL из системы репарации «мисматчей» различных организмов, *Биоорг. Хим.*, **46**, 563-579, doi: 10.31857/S0132342320060214.
75. Monakhova, M., Ryazanova, A., Kunetsky, V., Li, P., Shilkin, E., et al. (2020) Probing the DNA-binding center of the MutL protein from the *Escherichia coli* mismatch repair system via crosslinking and Förster resonance energy transfer, *Biochimie*, **171-172**, 43-54, doi: 10.1016/j.biochi.2020.02.004.
76. Монахова М. В., Милакина М. А., Савицкая В. Ю., Романова Е. А., Rao D. N., et al. (2021) Белок MutL из системы репарации мисматчей бактерии *Neisseria gonorrhoeae*: взаимодействие с АТР и ДНК, *Мол. Биол.*, **55**, 289-304, doi: 10.31857/S0026898421020117.
77. Monakhova, M. V., Penkina, A. I., Pavlova, A. V., Lyaschuk, A. M., Kucherenko, V. V., et al. (2018) Endonuclease activity of protein MutL from *Rhodobacter sphaeroides* mismatch repair system, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 281-293, doi: 10.1134/S0006297918030082.
78. Sancar, A., and Hearst, J. (1993) Molecular matchmakers, *Science*, **259**, 1415-1420, doi: 10.1126/science.8451638.
79. Putnam, C. D. (2021) Strand discrimination in DNA mismatch repair, *DNA Repair (Amst)*, **105**, 103161, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103161.
80. Guarné, A. (2012) The functions of MutL in mismatch repair, *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **110**, 41-70, doi: 10.1016/B978-0-12-387665-2.00003-1.
81. De Saro, F. J. L., Marinus, M. G., Modrich, P., and O'Donnell, M. (2006) The  $\beta$  sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14340-14349, doi: 10.1074/jbc.M601264200.
82. Lopez de Saro, F. J., and O'Donnell, M. (2001) Interaction of the sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8376-8380, doi: 10.1073/pnas.121009498.



83. Pluciennik, A., Burdett, V., Lukianova, O., O'Donnell, M., and Modrich, P. (2009) Involvement of the  $\beta$  clamp in methyl-directed mismatch repair *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **284**, 32782-32791, doi: 10.1074/jbc.M109.054528.
84. Fukui, K., Baba, S., Kumasaka, T., and Yano, T. (2016) Structural features and functional dependency on  $\beta$ -clamp define distinct subfamilies of bacterial mismatch repair endonuclease MutL, *J. Biol. Chem.*, **291**, 16990-17000, doi: 10.1074/jbc.M116.739664.
85. Nirwal, S., Kulkarni, D. S., Sharma, A., Rao, D. N., and Nair, D. T. (2018) Mechanism of formation of a toroid around DNA by the mismatch sensor protein, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 256-266, doi: 10.1093/nar/gkx1149.
86. Modrich, P. (1989) Methyl-directed DNA mismatch correction, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6597-6600, doi: 10.1016/S0021-9258(18)83467-6.
87. Liu, J., Hanne, J., Britton, B. M., Bennett, J., Kim, D., et al. (2016) Cascading MutS and MutL sliding clamps control DNA diffusion to activate mismatch repair, *Nature*, **539**, 583-587, doi: 10.1038/nature20562.
88. Groothuizen, F. S., Winkler, I., Cristóvão, M., Fish, A., Winterwerp, H. H., et al. (2015) MutS/MutL crystal structure reveals that the MutS sliding clamp loads MutL onto DNA, *Elife*, **4**, doi: 10.7554/eLife.06744.
89. Namadurai, S., Jain, D., Kulkarni, D. S., Tabib, C. R., Friedhoff, P., et al. (2010) The C-terminal domain of the MutL homolog from *Neisseria gonorrhoeae* forms an inverted homodimer, *PLoS One*, **5**, e13726, doi: 10.1371/journal.pone.0013726.
90. Banasik, M., and Sachadyn, P. (2014) Conserved motifs of MutL proteins, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, **769**, 69-79, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.07.006.
91. Sánchez-Romero, M. A., Cota, I., and Casadesús, J. (2015) DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome, *Curr. Opin. Microbiol.*, **25**, 9-16, doi: 10.1016/j.mib.2015.03.004.
92. Kwiatek, A., Łuczkiwicz, M., Bandyra, K., Stein, D. C., and Piekarczyk, A. (2010) *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 carries genes encoding two classes of Vsr endonucleases, *J. Bacteriol.*, **192**, 3951-3960, doi: 10.1128/JB.00098-10.
93. Bhagwat, A. S., and Lieb, M. (2002) Cooperation and competition in mismatch repair: very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **44**, 1421-1428, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02989.x.
94. Robertson, A. B., and Matson, S. W. (2012) Reconstitution of the very short patch repair pathway from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32953-32966, doi: 10.1074/jbc.M112.384321.
95. Cahoon, L. A., and Seifert, H. S. (2011) Focusing homologous recombination: pilin antigenic variation in the pathogenic *Neisseria*, *Mol. Microbiol.*, **81**, 1136-1143, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07773.x.
96. Ajiboye, T. O., Skiebe, E., and Wilharm, G. (2018) Contributions of RecA and RecBCD DNA repair pathways to the oxidative stress response and sensitivity of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **52**, 629-636, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.022.
97. Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., Lemasson, M., and Lestini, R. (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks, *DNA Repair (Amst)*, **6**, 967-980, doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.016.
98. Dillingham, M. S., and Kowalczykowski, S. C. (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 642-671, doi: 10.1128/MMBR.00020-08.
99. Beyene, G. T., Balasingham, S. V., Frye, S. A., Namouchi, A., Homberset, H., et al. (2016) Characterization of the *Neisseria meningitidis* helicase RecG, *PLoS One*, **11**, e0164588, doi: 10.1371/journal.pone.0164588.
100. Morimatsu, K., and Kowalczykowski, S. C. (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange, *Mol. Cell*, **11**, 1337-1347, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00188-6.
101. Mehr, I. J., and Seifert, H. S. (1998) Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair, *Mol. Microbiol.*, **30**, 697-710, doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01089.x.
102. Jacobsen, T., Bardiaux, B., Francetic, O., Izadi-Pruneyre, N., and Nilges, M. (2020) Structure and function of minor pilins of type IV pili, *Med. Microbiol. Immunol.*, **209**, 301-308, doi: 10.1007/s00430-019-00642-5.
103. Rotman, E., Webber, D. M., and Seifert, H. S. (2016) Analyzing *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation using 454 sequencing technology, *J. Bacteriol.*, **198**, 2470-2482, doi: 10.1128/JB.00330-16.
104. Obergfell, K. P., and Seifert, H. S. (2016) The pilin N-terminal domain maintains *Neisseria gonorrhoeae* transformation competence during pilus phase variation, *PLOS Genet.*, **12**, e1006069, doi: 10.1371/journal.pgen.1006069.
105. Killoran, M. P., Kohler, P. L., Dillard, J. P., and Keck, J. L. (2009) RecQ DNA helicase HRDC domains are critical determinants in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation and DNA repair, *Mol. Microbiol.*, **71**, 158-171, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06513.x.
106. Sechman, E. V., Kline, K. A., and Seifert, H. S. (2006) Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation, *Mol. Microbiol.*, **61**, 185-193, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05213.x.
107. Helm, R. A., and Seifert, H. S. (2009) Pilin antigenic variation occurs independently of the RecBCD pathway in *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Bacteriol.*, **191**, 5613-5621, doi: 10.1128/JB.00535-09.
108. Ozer, E. A., Prister, L. L., Yin, S., Ward, B. H., Ivanov, S., et al. (2019) PacBio amplicon sequencing



- method to measure pilin antigenic variation frequencies of *Neisseria gonorrhoeae*, *mSphere*, **4**, e00562-19, doi: 10.1128/mSphere.00562-19.
109. Kline, K. A., Criss, A. K., Wallace, A., and Seifert, H. S. (2007) Transposon mutagenesis identifies sites upstream of the *Neisseria gonorrhoeae pilE* gene that modulate pilin antigenic variation, *J. Bacteriol.*, **189**, 3462-3470, doi: 10.1128/JB.01911-06.
110. Cahoon, L. A., and Seifert, H. S. (2009) An alternative DNA structure is necessary for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *Science*, **325**, 764-767, doi: 10.1126/science.1175653.
111. Prister, L. L., Yin, S., Cahoon, L. A., and Seifert, H. S. (2020) Altering the *Neisseria gonorrhoeae pilE* guanine quadruplex loop bases affects pilin antigenic variation, *Biochemistry*, **59**, 1104-1112, doi: 10.1021/acs.biochem.9b01038.
112. Maizels, N., and Davis, L. (2018) Initiation of homologous recombination at DNA nicks, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6962-6973, doi: 10.1093/nar/gky588.
113. Cahoon, L. A., and Seifert, H. S. (2013) Transcription of a *cis*-acting, noncoding, small RNA is required for pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *PLoS Pathog.*, **9**, e1003074, doi: 10.1371/journal.ppat.1003074.
114. Prister, L. L., Ozer, E. A., Cahoon, L. A., and Seifert, H. S. (2019) Transcriptional initiation of a small RNA, not R-loop stability, dictates the frequency of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *Mol. Microbiol.*, **112**, 1219-1234, doi: 10.1111/mmi.14356.
115. Pavlova, A. V., Kubareva, E. A., Monakhova, M. V., Zvereva, M. I., and Dolinnaya, N. G. (2021) Impact of G-Quadruplexes on the regulation of genome integrity, DNA damage and repair, *Biomolecules*, **11**, 1284, doi: 10.3390/biom11091284.
116. Linke, R., Limmer, M., Juranek, S., Heine, A., and Paeschke, K. (2021) The relevance of G-quadruplexes for DNA repair, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12599, doi: 10.3390/ijms222212599.
117. Voter, A. F., Callaghan, M. M., Tippiana, R., Myong, S., Dillard, J. P., et al. (2020) Antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae* occurs independently of RecQ-mediated unwinding of the pilE G quadruplex, *J. Bacteriol.*, **202**, e00607-19, doi: 10.1128/JB.00607-19.
118. Davidsen, T., Tuven, H. K., Bjørås, M., Rødland, E. A., and Tønjum, T. (2007) Genetic interactions of DNA repair pathways in the pathogen *Neisseria meningitidis*, *J. Bacteriol.*, **189**, 5728-5737, doi: 10.1128/JB.00161-07.
119. Criss, A. K., Bonney, K. M., Chang, R. A., Duffin, P. M., LeCuyer, B. E., et al. (2010) Mismatch correction modulates mutation frequency and pilus phase and antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Bacteriol.*, **192**, 316-325, doi: 10.1128/JB.01228-09.
120. Fussenegger, M., Rudel, T., Barten, R., Ryll, R., and Meyer, T. F. (1997) Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae* – a review, *Gene*, **192**, 125-134, doi: 10.1016/S0378-1119(97)00038-3.
121. Ordabayev, Y. A., Nguyen, B., Niedziela-Majka, A., and Lohman, T. M. (2018) Regulation of UvrD helicase activity by MutL, *J. Mol. Biol.*, **430**, 4260-4274, doi: 10.1016/j.jmb.2018.08.022.
122. Vigué, L., and Eyre-Walker, A. (2019) The comparative population genetics of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*, *PeerJ*, **7**, e7216, doi: 10.7717/peerj.7216.
123. Boyce, K. J. (2022) Mutators enhance adaptive microevolution in pathogenic microbes, *Microorganisms*, **10**, 442, doi: 10.3390/microorganisms10020442.
124. Richardson, A. R., and Stojiljkovic, I. (2001) Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*, *Mol. Microbiol.*, **40**, 645-655, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02408.x.
125. Tauseef, I., Ali, Y. M., and Bayliss, C. D. (2013) Phase variation of PorA, a major outer membrane protein, mediates escape of bactericidal antibodies by *Neisseria meningitidis*, *Infect. Immun.*, **81**, 1374-1380, doi: 10.1128/IAI.01358-12.
126. Rotman, E., and Seifert, H. S. (2015) *Neisseria gonorrhoeae* MutS affects pilin antigenic variation through mismatch correction and not by pilE guanine quartet binding, *J. Bacteriol.*, **197**, 1828-1838, doi: 10.1128/JB.02594-14.
127. Pavlova, A. V., Monakhova, M. V., Ogloblina, A. M., Andreeva, N. A., Laptev, G. Y., et al. (2020) Responses of DNA mismatch repair Proteins to a stable G-quadruplex embedded into a DNA duplex structure, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8773, doi: 10.3390/ijms21228773.
128. Larson, E. D., Duquette, M. L., Cummings, W. J., Streiff, R. J., and Maizels, N. (2005) MutS $\alpha$  binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions, *Curr. Biol.*, **15**, 470-474, doi: 10.1016/j.cub.2004.12.077.
129. Ehrat, E. A., Johnson, B. R., Williams, J. D., Borchert, G. M., and Larson, E. D. (2012) G-quadruplex recognition activities of *E. coli* MutS, *BMC Mol. Biol.*, **13**, 23, doi: 10.1186/1471-2199-13-23.
130. Shukla, K., Thakur, R. S., Ganguli, D., Rao, D. N., and Nagaraju, G. (2017) *Escherichia coli* and *Neisseria gonorrhoeae* UvrD helicase unwinds G4 DNA structures, *Biochem. J.*, **474**, 3579-3597, doi: 10.1042/BCJ20170587.
131. Worth, L., Clark, S., Radman, M., and Modrich, P. (1994) Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3238-3241, doi: 10.1073/pnas.91.8.3238.

## ***Neisseria gonorrhoeae*: DNA REPAIR SYSTEMS AND THEIR ROLE IN PATHOGENESIS**

### **Review**

**V. Yu. Savitskaya<sup>1</sup>, M. V. Monakhova<sup>2</sup>, Iu. V. Iakushkina<sup>1</sup>,  
I. I. Borovikova<sup>3</sup>, and E. A. Kubareva<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; email: kubareva@belozersky.msu.ru*

<sup>3</sup> *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

*Neisseria gonorrhoeae* (gram-negative diplococcus) is a human pathogen and the causative agent of gonorrhea, a sexually transmitted infection. The bacterium uses various approaches for adapting to environmental conditions and multiply efficiently in the human body, such as regulation of gene expression of surface proteins and lipooligosaccharides (e.g. expression of various forms of pilin). DNA damage repair systems play an important role in the ability of bacteria to survive in the host organism. This review describes the DNA repair systems of *N. gonorrhoeae* and their role in bacterial pathogenesis. A special attention is paid to the mismatch repair system (MMR) and functioning of the MutS and MutL proteins, as well as to the role of these proteins in the regulation of the pilin antigenic variation of the *N. gonorrhoeae* pathogen.

**Keywords:** mismatch repair system, DNA damage repair, excision repair, MutS, MutL, antigenic variation, homologous recombination, G-quadruplex, *Neisseria gonorrhoeae*

## РОЛЬ СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

### Обзор

© 2022 Е.П. Турищева\*, М.С. Вильданова, Г.Е. Онищенко, Е.А. Смирнова

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: kitten-caterina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 05.05.2022

После доработки 28.06.2022

Принята к публикации 30.06.2022

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) — это мультифункциональный мембранный компартмент, одной из основных функций которого является котрансляционный перенос и процессинг секреторных, лизосомных и трансмембранных белков. Неправильный процессинг белков при нарушении гомеостаза ЭПР приводит к состоянию, которое называется «стресс ЭПР». Для восстановления нормально функционирования ЭПР активируется адаптивный механизм, который обозначают как ответ на неправильно свернутые белки или UPR. Помимо контроля сворачивания белков, UPR играет ключевую роль в других физиологических процессах, в частности в дифференцировке клеток соединительнотканного, мышечного, эпителиального и нейрального происхождения. Однако дифференцировку стимулирует только физиологический уровень стресса ЭПР, в то время как его повышенный уровень подавляет дифференцировку и может вызвать гибель клеток. Следует отметить, что до настоящего времени неизвестно, является ли активация UPR индуктором дифференцировки клеток или же UPR запускается из-за повышенного синтеза секреторных белков в процессе дифференцировки. Дифференцировка клеток является важным этапом в развитии многоклеточных организмов, поэтому этот процесс строго контролируется. Подавление или, наоборот, избыточная активация дифференцировки ведут к развитию патологических процессов в организме. В частности, нарушения в ходе дифференцировки клеток соединительнотканного происхождения ведут к развитию таких заболеваний, как фиброз, ожирение и остеопороз. Фиброз в настоящее время вызывает особый интерес, так как является одним из основных последствий COVID-19. В связи с этим изучение роли UPR в активации дифференцировки представляет как теоретический, так и практический интерес, так как может привести к идентификации потенциальных молекулярных мишеней, позволяющих селективно регулировать разные этапы дифференцировки и воздействовать на механизмы, ведущие к развитию патологических процессов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эндоплазматический ретикулум, дифференцировка, стресс эндоплазматического ретикулума, UPR, миофибробласты, фиброз, адипогенез, миогенез, остеобластогенез, остеокластогенез.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090032, **EDN:** AZTMDJ

Принятые сокращения: ПТГ – паратиреоидный гормон; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4 (activating transcription factor 4); ATF6 – активирующий фактор транскрипции 6 (activating transcription factor 6); BiP – белок, связывающий иммуноглобулин (immunoglobulin binding protein); BMP2 – костный морфогенетический белок 2 (bone morphogenetic protein 2); BSP – костный сиалопротеин (bone sialoprotein); C/EBP $\alpha$  – ССААТ/энхансер-связывающий белок  $\alpha$  (ССААТ/enhancer-binding protein  $\alpha$ ); СНОР – ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку (ССААТ/enhancer-binding protein homologous protein); eIF2 $\alpha$  – фактор инициации трансляции эукариот 2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ); ERAD – ЭПР-ассоциированная деградация (ER-associated degradation); GRP78 – белок 78 кДа, регулируемый глюкозой (glucose-regulated protein 78); IRE1 – требующий инозитол белок 1 (inositol-requiring protein 1); MEF – эмбриональные фибробласты мыши (murine embryonic fibroblasts); MyoD – белок детерминации миобластов 1 (myoblast determination protein 1); NFATc1 – ядерный фактор активированных Т-клеток, цитоплазматический 1 (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1); OCN – остеокальцин; Osx – транскрипционный фактор Osterix; 4-РВА – 4-фенилмасляная кислота (4-phenylbutyric acid); PERK – киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase); PPAR $\gamma$  – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ); Ppp1cc – каталитическая субъединица протеинфосфатазы 1  $\gamma$  (protein phosphatase 1 catalytic subunit  $\gamma$ ); RANK – рецептор-активатор ядерного фактора NF- $\kappa$ B (receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B); RANKL – лиганд RANK; Runx2 – фактор транскрипции 2, связанный с доменом runt (runt-related transcription factor 2); sXBP1 – сплайсированный X-box-связывающий белок 1 (spliced X-box-binding protein 1);

## ВВЕДЕНИЕ

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) — это мультифункциональный мембранный компартмент, одной из основных функций которого является котрансляционный перенос секреторных, лизосомных и трансмембранных белков, их модификация и сворачивание [1]. В этих процессах участвует множество разных ферментов и белков-шаперонов ЭПР [2]. Для нормального функционирования белков необходим их безошибочный синтез и сворачивание, поэтому в ЭПР существует контроль качества свёрнутых белков. Неправильно свёрнутые белки узнаются шаперонами (например, BiP (белок, связывающий иммуноглобулин), ERdj (семейство локализованных в ЭПР DnaJ-подобных белков)) и лектинами (например, OS-9 (белок, высокоэкспрессирующийся в остеосаркомах-9) и ХТР3-В (ХТР3-*транс*-активированный ген-В)), ретротранслоцируются из ЭПР в цитозоль, полиубиквитинируются и деградируют в протеосомах [2–4]. Этот процесс называется ЭПР-ассоциированной деградацией (ERAD) [2].

Для нормального функционирования ЭПР необходим баланс между синтезируемыми в ЭПР ещё не свёрнутыми белками и активностью шаперонов ЭПР [1]. Различные физиологические состояния и патологические факторы могут нарушить этот баланс, что приводит к накоплению в ЭПР не свёрнутых и неправильно свёрнутых белков. Это состояние носит название «стресс ЭПР» [5]. Стресс ЭПР может индуцироваться при увеличении количества не свёрнутых белков в ЭПР, например, из-за повышения потребности в белках для секреции в секреторных клетках, или при нарушении процесса сворачивания белков, например, из-за мутаций или воздействия химических агентов (дифтотрептола, туникамицина, тапсигаргина, брэфельдина А и др.) [6–10]. Нарушение кальциевого гомеостаза, окислительно-восстановительного статуса ЭПР, гипоксия, глюкозное голодание, перегруженность ЭПР холестерином, депривация питательных веществ и повышение температуры до 40 градусов также могут приводить к нарушению сворачивания белков и стрессу ЭПР [8–10].

Для восстановления нормального функционирования ЭПР и, в частности, его способности сворачивать белки, в клетках в ответ на

стресс ЭПР активируется сигнальный каскад, известный как ответ на неправильно свёрнутые белки, или UPR [2, 11]. UPR — это адаптивный ответ, изначально нацеленный на нормализацию гомеостаза клетки и её выживание [9, 10]. Активация UPR оказывает влияние почти на каждый аспект секреторного пути в клетке, модифицируя интенсивность синтеза белков и их транслокации в ЭПР, сворачивание белков, созревание и контроль качества свёрнутых белков, перенос белков по секреторному пути и элиминацию неправильно свёрнутых белков с помощью аутофагии и ERAD [11].

UPR может запускаться тремя сенсорными трансмембранными белками ЭПР: IRE1 (требующий инозитол белок 1), PERK (киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA) и ATF6 (активирующий фактор транскрипции 6) [2]. Домены этих белков, находящиеся в просвете ЭПР (люминальные домены), в отсутствие стресса ЭПР связаны с шапероном ЭПР BiP или GRP78 (белок 78 кДа, регулируемый глюкозой), которые за счёт этой связи не дают им активироваться. В условиях стресса ЭПР BiP отсоединяется от сенсоров, что приводит к их активации [9]. Таким образом, IRE1, PERK и ATF6 «отслеживают», справляется ли свёртывающий аппарат ЭПР с имеющимся объёмом белков [2].

Каждый сенсор стресса ЭПР (IRE1, PERK и ATF6) при активации запускает свой сигнальный каскад (путь). Следует отметить, что в зависимости от индуктора стресса ЭПР и клеточного типа могут активироваться не все пути UPR, а два или один из возможных [1].

Если с помощью активации UPR не удаётся восстановить нормальное функционирование ЭПР, то активируются сигнальные пути, запускающие гибель клетки [1, 2]. Таким образом, хронический стресс ЭПР и продолжительный UPR могут приводить к нарушению функционирования клетки и её гибели [1, 12]. Это, в свою очередь, вовлечено в развитие хронических заболеваний у человека, таких как нейродегенеративные заболевания, диабет, фиброз лёгких и воспалительные процессы [12].

Однако гибель или выживание клетки не являются единственными последствиями стресса ЭПР, так как помимо контроля сворачивания белков UPR играет ключевую роль в различных физиологических процессах, таких как врождённый иммунитет, метаболизм

Принятые сокращения (продолжение): TGF- $\beta$  — трансформирующий фактор роста  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ); TUDCA — тауро-урсодезоксихолевая кислота (taurooursodeoxycholic acid); UPR — ответ на неправильно свёрнутые белки (unfolded protein response); XBP1 — X-бокс-связывающий белок 1 (X-box-binding protein 1);  $\alpha$ -SMA — гладкомышечный актин  $\alpha$  ( $\alpha$ -smooth muscle actin).

\* Адресат для корреспонденции.

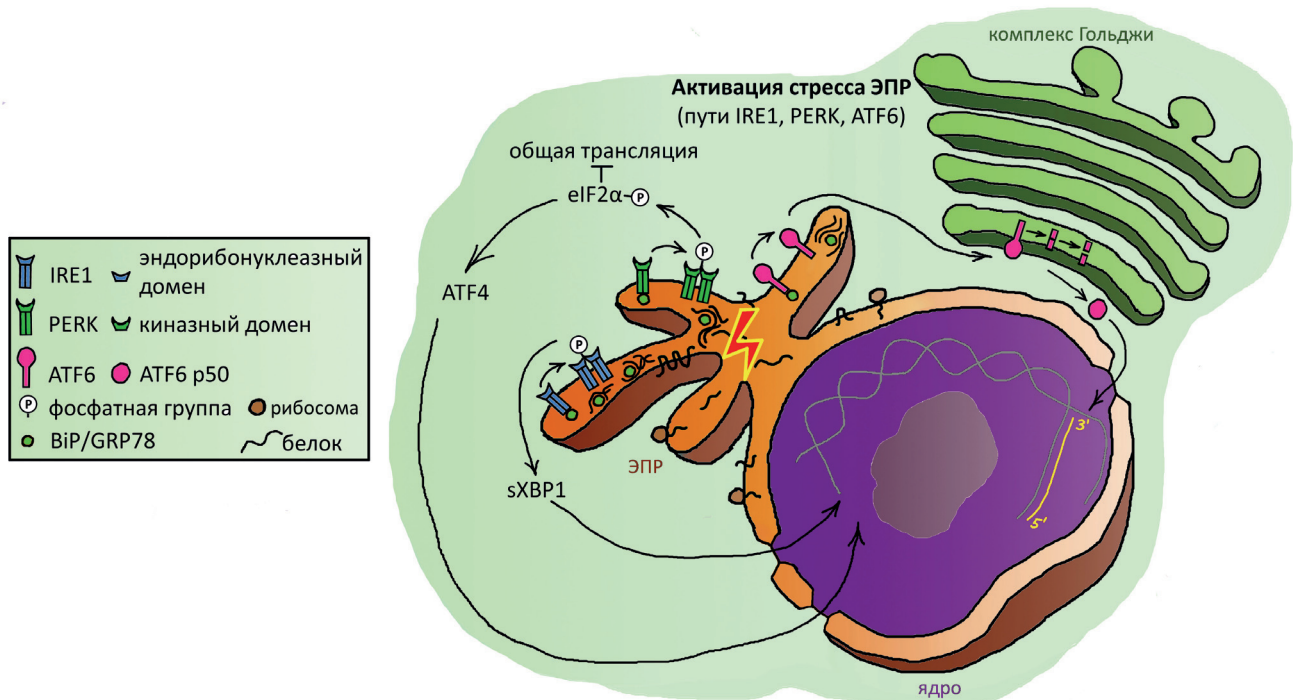


глюкозы и липидов, а также дифференцировка клеток [11]. Физиологический стресс ЭПР участвует в дифференцировке клеток соединительнотканного, мышечного, эпителиального и нейрального происхождения [13–16]. Так, например, физиологический стресс ЭПР, вызванный растительными гормонами, гиббереллиновой и жасмоновой кислотами, индуцирует усиление дифференцировки иммортализованных кератиноцитов линии HaCaT и появление признаков дифференцировки в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 [17, 18]. Помимо этого, гиббереллиновая и абсцизовая кислоты вызывают морфологические признаки стресса ЭПР в клетках соединительнотканного происхождения – дермальных фибробластах человека и клетках фибросаркомы человека линии HT1080 [19]. Целью данного обзора является анализ данных, посвящённых участию стресса ЭПР и UPR в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения, в частности фибробластов, преадипоцитов, миобластов, остеобластов и остеокластов.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПУТЕЙ UPR

UPR может запускаться тремя трансмембранными сенсорами стресса ЭПР – киназами IRE1 и PERK и транскрипционным фактором ATF6, находящимися на мембране ЭПР. В условиях стресса ЭПР от люминальных доменов этих сенсорных белков отсоединяется шаперон BiP, в результате чего сенсоры активируются и каждый запускает свой сигнальный каскад (путь) (рис. 1).

**Путь, активируемый IRE1.** Трансмембранная киназа IRE1 после освобождения от связи с BiP олигомеризуется и аутофосфорилируется, что ведёт к её активации [10]. Активированная IRE1 с помощью своего эндорибонуклеазного домена осуществляет сплайсинг мРНК, кодирующей транскрипционный фактор XBP1. Этот домен вырезает 26-нуклеотидный интрон и смещает рамку считывания, в результате чего синтезируется активный транскрипционный фактор sXBP1 («s» означает «сплайсированный») [11, 20]. Этот транскрипционный фактор повышает



**Рис. 1.** Ключевые события стресса ЭПР и UPR (ответ на неправильно свёрнутые белки) после отделения BiP/GRP78 (белок, связывающий иммуноглобулин/белок 78 кДа, регулируемый глюкозой) от трёх трансмембранных сенсорных белков ЭПР – IRE1 (требующий инозитол белок 1), PERK (киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA) и ATF6 (активирующий фактор транскрипции 6). IRE1 олигомеризуется и аутофосфорилируется; его эндорибонуклеазный домен осуществляет сплайсинг мРНК XBP1 (X-box-связывающий белок 1), в результате чего синтезируется активный транскрипционный фактор sXBP1. PERK олигомеризуется, аутофосфорилируется и фосфорилирует eIF2α (фактор инициации трансляции эукариот 2α), подавляя общую трансляцию в клетке и усиливая трансляцию ATF4 (активирующий фактор транскрипции 4) – транскрипционного фактора генов-мишеней UPR. ATF6 перемещается в комплекс/аппарат Гольджи и разрезается протеазами. В результате высвобождается цитоплазматический фрагмент (ATF6 p50), который перемещается в ядро, где работает как транскрипционный фактор. Расшифровка графических символов этой части рисунка приведена в зелёном квадрате слева

экспрессию генов белков, вовлечённых в транслокацию синтезируемых белков в ЭПР, их сворачивание (например, дисульфид-изомеразы PDI) и секрецию, а также деградацию неправильно свёрнутых белков (например, EDEM (усиливающий деградацию  $\alpha$ -маннидозоподобный белок ЭПР), участвующий в ERAD) и продукцию липидных компонентов ЭПР (например, холин цитидилтрансфераза) [1, 11, 21, 22].

**Путь, активируемый PERK.** Трансмембранная киназа PERK после освобождения от связи с BiP олигомеризуется, аутофосфорилируется и фосфорилирует Ser51 на  $\alpha$ -субъединице инициаторного фактора трансляции eIF2 [10, 23]. Фосфорилированный eIF2 $\alpha$  препятствует инициации трансляции, что ведёт к подавлению трансляции большинства мРНК [23]. В результате в ЭПР перестают поступать синтезируемые белки, что снижает нагрузку на ЭПР, связанную с правильной укладкой белков [2]. При этом мРНК транскрипционного фактора ATF4, наоборот, транслируются в присутствии фосфорилированного eIF2 $\alpha$  [11, 23]. ATF4 активирует транскрипцию генов-мишеней UPR, кодирующих факторы, вовлечённые в биосинтез аминокислот, антиоксидантный ответ, аутофагию и апоптоз [11, 23]. Подавление трансляции с помощью eIF2 $\alpha$  обратимо: ATF4 повышает уровень активности регуляторной субъединицы белковой фосфатазы PP1 – GADD34 (белок, индуцируемый остановкой роста и повреждением ДНК), таким образом участвуя в петле обратной связи, направленной на дефосфорилирование eIF2 $\alpha$  и восстановление нормального уровня синтеза белка [11].

**Путь, активируемый ATF6.** Трансмембранный белок ATF6 после освобождения от связи с BiP перемещается в составе COPII-окаймлённых везикул от ЭПР к аппарату Гольджи, где он разрезается протеазами S1P и S2P [11, 24]. В результате высвобождается цитоплазматический фрагмент ATF6 – ATF6 p50, который перемещается в ядро и работает как транскрипционный фактор вместе с sXBP1 [11]. ATF6 p50 и sXBP1 активируют транскрипцию генов, кодирующих шапероны и ферменты ЭПР, которые стимулируют транслокацию белков в ЭПР, их сворачивание (например, шапероны GRP78, GRP94, кальнексин), процессинг и секрецию, а также деградацию неправильно свёрнутых белков [1, 11, 25, 26]. Кроме того, ATF6 p50 и sXBP1 стимулируют биогенез ЭПР и аппарата Гольджи в условиях стресса ЭПР [11].

**Активация гибели при хроническом стрессе ЭПР.** При высоком уровне хронического стресса ЭПР с помощью IRE1 запускается сигнальный путь TNF (фактор некроза опухоли),

рекрутируется медиатор этого сигнального пути – TRAF2 (ассоциированный с рецептором TNF фактор 2) и активируется киназа ASK1 (киназа 1 сигналинга апоптоза). ASK1 активирует киназу JNK (с-Jun N-терминальная белковая киназа), которая участвует в запуске апоптоза, регулируя белки семейства BCL2 (В-клеточная лимфома 2) [1, 10]. Кроме того, ATF4, участвующий в сигнальном пути PERK/eIF2 $\alpha$ , может активировать экспрессию проапоптотического фактора CHOP (ССАТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку). Этот фактор регулирует белки семейства BCL-2, DR5 (рецептор смерти 5) и GADD34 (регуляторная субъединица белковой фосфатазы PP1) и стимулирует стресс-опосредованную индукцию апоптоза [11].

Таким образом, UPR – это адаптивный ответ, изначально нацеленный на выживание клеток, но запускающий их гибель в случае, если восстановить нормальное функционирование ЭПР не удаётся [1, 2, 9, 10]. Однако, помимо контроля сворачивания белков, UPR играет ключевую роль в физиологических процессах, таких как дифференцировка клеток соединительнотканного, мышечного, эпителиального и нейрального происхождения [11, 13–16]. Данный обзор посвящён роли стресса ЭПР и UPR в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения, в частности фибробластов, предипоцитов, миоцитов, остеобластов и остеокластов.

## UPR И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ФИБРОБЛАСТОВ В МИОФИБРОБЛАСТЫ

Фибробласты – клетки соединительной ткани, синтезирующие и секретирующие компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген, фибронектин, эластин, гиалуроновая кислота и другие гликозаминогликаны, матриксные металлопротеиназы (MMPs), тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs) и др. [14, 27]. Фибробласты участвуют в построении и ремоделировании внеклеточного матрикса, заживлении ран, воспалении и ангиогенезе [27]. При ранении фибробласты перемещаются в повреждённый участок, где пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты [14, 27]. Миофибробласты совмещают в себе признаки фибробластов, например, хорошо выраженный гранулярный ЭПР и аппарат Гольджи, и признаки гладкомышечных клеток – развитый сократительный аппарат, содержащий гладкомышечный актин ( $\alpha$ -SMA). В миофибробластах, по сравнению с фибро-

бластами, повышен синтез коллагена I, фибронектина и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), увеличено количество фокальных контактов и стресс-фибрилл, повышена контрактильная способность, снижена миграционная активность [14, 28]. Миофибробласты участвуют в заживлении ран, восстанавливая внеклеточный матрикс в качестве каркаса для регенерации ткани, и стягивают края раны за счёт своей контрактильной активности [27].

При нормальном заживлении ран и восстановлении целостности тканей миофибробласты погибают путём апоптоза [14, 28]. Если процессы заживления раны нарушаются, миофибробласты остаются в раневой зоне, где затем развивается фиброз, характеризующийся избыточным отложением внеклеточного матрикса и нерегулируемой контрактильной активностью миофибробластов [28, 29]. Фиброз также может развиваться при хроническом воспалении, вызванном ядовитыми веществами, инфекциями и механическими повреждениями, или как результат аутоиммунных реакций (склеродермии, язвенного колита, болезни Крона и ревматоидного артрита) [29]. Поскольку объём и упругость внеклеточного матрикса играют решающую роль в структурной и функциональной целостности тканей, избыточное количество внеклеточного матрикса при фиброзе приводит к развитию и усугублению дисфункции тканей. Например, идиопатический лёгочный фиброз характеризуется накоплением миофибробластов и ремоделированием внеклеточного матрикса, что приводит к нарушению строения лёгких и прогрессирующему фиброзу [30]. Фиброзу подвержены почти все ткани организма, в том числе печень, почки и сердце [27, 29]. Присутствие миофибробластов отмечено в активно сокращающейся грануляционной ткани и гипертрофических рубцах, а также в сократительных тканях ладонной фасции при болезни Дюпюитрена [14]. В связи с этим изучение механизмов дифференцировки фибробластов в миофибробласты является важным звеном в поиске способов предотвращения и лечения фиброза, а также смягчения его проявлений. Для моделирования фиброза *in vitro* часто используют многофункциональный цитокин TGF- $\beta$ , который считается основным индуктором дифференцировки фибробластов в миофибробласты [14, 28, 31].

Исследования *in vitro* показали, что стресс ЭПР участвует в дифференцировке фибробластов, выделенных из разных тканей, в миофибробласты [14, 29, 31, 32], а ингибирование стресса ЭПР приводит к подавлению такой дифференцировки [31, 33, 34].

Так, например, при индукции дифференцировки лёгочных фибробластов человека и мыши в миофибробласты с помощью TGF- $\beta$  значительно повышается уровень синтеза GRP78, sXBP1 и ATF6 [31]. При этом уровень синтеза СНОР и фосфорилированного eIF2 $\alpha$  не изменяется, что, возможно, связано с антиапоптотическим эффектом TGF- $\beta$ . Напротив, ингибирование стресса ЭПР с помощью химического шаперона, 4-фенилмасляной кислоты (4-PBA), подавляет не только развитие UPR, но и экспрессию генов, кодирующих  $\alpha$ -SMA и коллаген I (основных маркёров дифференцировки миофибробластов). Кроме того, индукция синтеза  $\alpha$ -SMA и коллагена I с помощью TGF- $\beta$  подавляется при нокдауне GRP78, что свидетельствует о необходимости участия компонентов UPR в дифференцировке [31]. 4-PBA также оказывает антифибротическое воздействие при TGF- $\beta$ -индуцированной дифференцировке первичных синовиальных фибробластов крыс в миофибробласты [33]. Стресс ЭПР активируется и при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью эндотелина-1 и тромбина [32].

Интересно, что 1%-ный экстракт сигаретного дыма вызывает дифференцировку лёгочных эмбриональных фибробластов человека (MRC-5) в миофибробласты тоже путём индукции стресса ЭПР [35]. При действии данного фактора в фибробластах повышается синтез белков  $\alpha$ -SMA, GRP78, IRE1, XBP1 и ATF6. Обработка 4-PBA или нокдаун GRP78 до воздействия снижает индуцированную экстрактом сигаретного дыма дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Однако остаётся неизвестным, является ли влияние экстракта сигаретного дыма на дифференцировку фибробластов результатом воздействия одного или нескольких компонентов экстракта или обусловлено совместным действием всех его компонентов [35].

Ингибирование активности отдельных путей UPR показало их важность в активации дифференцировки фибробластов в миофибробласты, однако пока ещё неясно, насколько равнозначно влияние каждого из них [29, 32, 36].

**Роль сигнального пути IRE1.** Ингибирование IRE1 с помощью селективного ингибитора 4 $\mu$ 8C (производное салицилового альдегида, подавляющее РНКазную активность IRE1) блокирует индуцированную TGF- $\beta$  дифференцировку эмбриональных лёгочных фибробластов человека в миофибробласты, снижая экспрессию и синтез  $\alpha$ -SMA и коллагена I [29]. Снижение экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ -SMA, наблюдается в эмбриональных лёгоч-



ных фибробластах человека при подавлении РНКазной активности IRE1 и в эмбриональных фибробластах мыши с нокаутом *IRE1*. Кроме того, IRE1 разрезает miRNA-150, что снимает ингибирующий эффект этой микроРНК на экспрессию  $\alpha$ -SMA, который miRNA-150 осуществляет через подавление экспрессии транскрипционного фактора c-Myc. По этому механизму осуществляется снижение индуцированной TGF- $\beta$  экспрессии  $\alpha$ -SMA при подавлении РНКазной активности IRE1. При этом sXBP1 стимулирует синтез фосфатидилхолина – основного фосфолипида мембраны ЭПР, что вносит вклад в увеличение площади ЭПР. Это, в свою очередь, необходимо для более эффективного синтеза белков в ходе дифференцировки фибробластов в миофибробласты [29, 37]. Соответственно, при нокдауне *XBP1* увеличение площади ЭПР и секреция коллагена, индуцированные с помощью TGF- $\beta$ , подавляются [29].

**Роль сигнального пути PERK.** Нокдаун *PERK* подавляет дифференцировку эмбриональных лёгочных фибробластов человека линии WI-38 в миофибробласты [32]. При индукции дифференцировки с помощью эндотелина-1 или тромбина, но при отсутствии PERK не происходит повышения синтеза  $\alpha$ -SMA, коллагена I и коллагена IV. При этом ингибитор киназы JNK также подавляет индуцированную эндотелином-1 или тромбином дифференцировку этих фибробластов в миофибробласты, в частности, в клетках не повышается синтез  $\alpha$ -SMA. Это может свидетельствовать о том, что JNK активирует PERK, а PERK, в свою очередь, необходимо для активации синтеза  $\alpha$ -SMA.

**Роль сигнального пути ATF6.** Исследования показали, что ATF6 препятствует дифференцировке фибробластов желудочков сердца в миофибробласты. В частности, подавление активности ATF6 с помощью нокаута или нокдауна приводит к усилению профиброзного эффекта TGF- $\beta$  [36]. Напротив, дополнительная фармакологическая активация ATF6 с помощью низкомолекулярного активатора *N*-(2-гидрокси-5-метилфенил)-3-фенилпропанамида (compound 147) снижает экспрессию  $\alpha$ -SMA и подавляет профиброзное действие TGF- $\beta$ . Предполагается, что ATF6 подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты за счёт ингибирования TGF- $\beta$ -опосредованного сигналинга через посредник Smad и снижения экспрессии генов, кодирующих TGF- $\beta$  и его рецепторы. В частности, при активации ATF6 с помощью compound 147 активность некоторых профиброзных генов, например генов матриксных металлопротеаз и рецепторов к

TGF- $\beta$ , снижается, а при нокдауне *ATF6* – повышается [36].

**Влияние индукторов стресса ЭПР на дифференцировку фибробластов в миофибробласты.** Стресс ЭПР может быть индуцирован химическими агентами, такими как туникамицин и тапсигаргин. Туникамицин – это антибиотик, блокирующий N-гликозилирование белков в ЭПР, что приводит к нарушению начальной стадии биосинтеза гликопротеинов, накоплению несвёрнутых гликопротеинов в ЭПР и стрессу ЭПР [1]. Тапсигаргин – это сесквитерпеновый лактон, который блокирует работу кальциевых АТФаз (SERCA) и приводит к потере активности кальций-зависимых шаперонов, накоплению несвёрнутых белков и стрессу ЭПР. Оказалось, что туникамицин и тапсигаргин способны индуцировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Так, например, при действии туникамицина или тапсигаргина на первичные лёгочные фибробласты человека наблюдается повышение уровня синтеза  $\alpha$ -SMA и коллагена I, а при нокдауне *GRP78* индукция синтеза  $\alpha$ -SMA и коллагена I подавляется [31]. Стресс ЭПР, индуцированный тапсигаргином, также повышает экспрессию генов, кодирующих коллаген I и  $\alpha$ -SMA, в синовиальных фибробластах крыс [33]. Постоянная активация стресса ЭПР с помощью туникамицина в первичных фибробластах кожи мыши индуцирует дифференцировку этих клеток в миофибробласты. В клетках повышается экспрессия  $\alpha$ -SMA и контрактильная активность, они приобретают более распластанную форму [14]. Туникамицин и тапсигаргин также повышают синтез  $\alpha$ -SMA и коллагена IV и стимулируют дифференцировку эмбриональных лёгочных фибробластов человека линии WI-38 в миофибробласты [32]. При этом нокдаун гена *PERK* или ингибирование PERK с помощью ингибитора GSK2606414 подавляет индуцированный тапсигаргином синтез  $\alpha$ -SMA и коллагена IV.

Таким образом, сигнальные пути активации стресса ЭПР могут оказывать разнонаправленное действие на дифференцировку фибробластов в миофибробласты: если необходимо стимулировать дифференцировку, следует активировать IRE1- и PERK-зависимые механизмы индукции стресса ЭПР; если же необходимо подавить признаки дифференцировки, то следует воздействовать на сигнальный путь ATF6.

## UPR И АДИПОГЕНЕЗ

Адиipoциты являются основным компонентом жировой ткани. Их функция состоит в кон-



троле энергетического баланса путём хранения триацилглицерина в периоды избытка энергии и его мобилизация во время недостатка энергии [38]. Адипоциты являются метаболически активными клетками, способными синтезировать и секретировать различные белки, включая гормоны (например, лептин и адипонектин) и цитокины [39]. Адипоциты дифференцируются из преадипоцитов [38], и ключевую роль в дифференцировке адипоцитов (адипогенезе) играют транскрипционные факторы C/EBP $\beta$  и C/EBP $\delta$  (ССААТ/энхансер-связывающие белки  $\beta$  и  $\delta$ ), которые активируются очень рано и запускают экспрессию рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом PPAR $\gamma$  и ССААТ/энхансер-связывающего белка  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ). PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  – два ключевых адипогенных фактора, которые позитивно регулируют друг друга для стимулирования и поддержания дифференцировочного статуса [40]. Следует отметить, что в ходе адипогенеза преадипоциты претерпевают значительные морфологические изменения. Так, например, они меняют свою форму с фибробластоподобной на кубическую, в них появляется большое количество липидных капель [39–41].

При исследовании адипогенеза *in vitro* активацию дифференцировки проводят с помощью специального дифференцировочного коктейля, содержащего инсулин, изобутилметилксантин, дексаметазон и троглитазон. В качестве преадипоцитов обычно используют клетки линии 3T3-L1 или эмбриональные фибробласты мыши (MEF) [39, 40, 42–47].

Как оказалось, дифференцировка адипоцитов *in vitro* и *in vivo* сопровождается активацией стресса ЭПР [39, 45–47], причём в системе *in vitro* уровень синтеза фосфорилированного eIF2 $\alpha$  и sXBP1 повышается на ранней стадии дифференцировки и затем постепенно снижается, а уровень синтеза СНОР, наоборот, снижается на ранней стадии дифференцировки и затем повышается на более поздних стадиях [39, 45, 46]. Ингибирование стресса ЭПР *in vitro* с помощью химических шаперонов 4-РВА или тауро-урсодезоксихолевой кислоты (TUDCA) подавляет адипогенез. Это выражается в том, что уменьшается количество липидных капель и не происходит изменение формы клеток, а при действии 4-РВА также снижается секреция адипонектина. При этом импульсное добавление 4-РВА блокирует накопление липидов на всех стадиях дифференцировки, от ранней (0–2 дни) до поздней (6–10 дни), что свидетельствует о важности UPR для адипогенеза на всех его стадиях. Тем не менее наиболее значительное подавление накопления липидов

при завершении дифференцировки наблюдается при добавлении 4-РВА на более поздних стадиях адипогенеза. В экспериментах *in vivo* добавление 4-РВА в питьевую воду самкам мышей C57BL/6 вызывает замедление увеличения веса и снижение массы жировых прослоек, а также уменьшает размер адипоцитов. Кроме того, 4-РВА снижает уровень синтеза GRP78 в жировой ткани. Такой эффект 4-РВА *in vivo*, по-видимому, связан с тем, что 4-РВА подавляет рекрутирование и дифференцировку преадипоцитов и препятствует гипертрофии имеющихся адипоцитов [39].

Ингибирование адипогенеза при подавлении стресса ЭПР было также обнаружено при воздействии нетепловой атмосферной плазмы (ионизированный газ), клиническое применение которой изучают в последние десятилетия. Полученный авторами исследования раствор плазмы, воздействуя в течение 4 дней, подавлял адипогенную дифференцировку клеток линии 3T3-L1, параллельно ингибируя стресс ЭПР и активацию UPR в ходе адипогенеза [47].

Исследования показали, что для успешного прохождения адипогенеза необходимы все три пути активации UPR [40, 43, 44, 48].

**Роль сигнального пути IRE1.** Было показано, что ключевой ранний адипогенный фактор C/EBP $\beta$  напрямую связывается с промотором гена, кодирующего XBP1, и индуцирует его экспрессию. Затем sXBP1 связывается с промотором другого критически важного для адипогенеза транскрипционного фактора – C/EBP $\alpha$  – и индуцирует его экспрессию. Нокдаун XBP1 или IRE1 в клетках MEF или 3T3-L1 приводит к глубоким нарушениям адипогенеза, в частности, в клетках почти не формируются липидные капли. В ходе адипогенеза в клетках 3T3-L1 не происходит гиперфосфорилирования IRE1, хотя оно происходит при индукции UPR с помощью тапсигаргина. Интересно, что индукция ожирения у мышей вызывает появление гиперфосфорилированного IRE1. Возможно, это связано с тем, что физиологический UPR активируется в ходе раннего адипогенеза и затем поддерживается на относительно низком уровне в зрелых адипоцитах, а последующее ожирение ассоциировано с повышением уровня UPR [40].

Однако, по данным других исследователей, активация или делеция IRE1 не изменяла дифференцировку в клетках 3T3-L1 [45], что противоречит результатам, описанным выше [40].

**Роль сигнального пути PERK.** Как оказалось, PERK-опосредованный механизм индукции стресса ЭПР тоже участвует в регуляции липогенной программы в ходе адипогенеза.

Так, например, при отсутствии PERK ингибируется повышение экспрессии липогенных ферментов SREBP-1c (белок, связывающийся с регуляторным элементом стерола-1c), FAS (синтаза жирных кислот) и SCD1 (стеарил-КоА-дегидрогеназа-1), подавляется накопление липидных капель. При этом PERK в ходе стимулирования дифференцировки адипоцитов проявляет активность липидной киназы по отношению к диацилглицеролу [44, 49]. Однако уровень синтеза мишени PERK – белка SNOB – снижается на ранней стадии дифференцировки и затем повышается на более поздних стадиях. Это свидетельствует о необходимости снижения активности PERK на ранней стадии дифференцировки адипоцитов [39, 45, 46]. При этом стимуляция фосфорилирования eIF2 $\alpha$  при отсутствии стресса ЭПР снижает эффективность адипогенеза в клетках 3T3-L1, а подавление фосфорилирования eIF2 $\alpha$ , напротив, стимулирует адипогенез *in vitro* и *in vivo* [45]. Стимулированная продукция SNOB при отсутствии стресса ЭПР также ингибирует адипогенез в клетках 3T3-L1 [41, 45]. Такое ингибирующее влияние SNOB на адипогенез, возможно, связано со способностью SNOB образовывать гетеродимер с C/EBP $\alpha$  и  $\beta$  и препятствовать связыванию образовавшегося гетеродимера с классическими сайтами связывания для C/EBP [41, 50]. То есть SNOB в этой системе функционирует как негативный регулятор адипогенеза [39, 41]. Поэтому, возможно, снижение экспрессии SNOB на ранней стадии дифференцировки, показанное многими авторами, связано с тем, что такое снижение необходимо для работы адипогенных генов семейства C/EBP, активности которых SNOB препятствует.

**Роль сигнального пути ATF6.** Сенсор стресса ЭПР, ATF6, также важен для нормального адипогенеза. Нокдаун *ATF6* в мезенхимных стромальных клетках линии C3H10T1/2 приводит к подавлению накопления липидов, значительному снижению экспрессии *PPAR $\gamma$* , липогенного транскрипционного фактора SREBP-1c, чувствительного к инсулину переносчика глюкозы GLUT4 и связывающегося с жирными кислотами белка aP2. При этом разница в экспрессии *PPAR $\gamma$*  в клетках с нокдауном *ATF6* и контрольных клетках по мере прохождения этапов адипогенеза становится всё более значительной. Кроме того, в клетках с нокдауном *ATF6* менее выражена стимуляция экспрессии раннего транскрипционного фактора адипогенеза C/EBP $\beta$  [48].

Следует отметить, что в ряде работ присутствуют данные об ингибирующем влиянии

стресса ЭПР на дифференцировку адипоцитов [41, 42, 45, 51]. Так, например, соединение K-7174 (синтетический низкомолекулярный ингибитор транскрипционных факторов GATA, который участвует в поддержании преадипоцитов в недифференцированном состоянии), а также индукторы стресса ЭПР – туникамицин, A23187 и тапсигаргин, ингибировали адипогенез клеток линии 3T3-L1 [42, 45]. Кроме того, туникамицин и тапсигаргин подавляли дифференцировку бежевых адипоцитов, развитие которых повышает термогенез путём рассеивания избыточной химической энергии через опосредованное разобщающим белком 1 (UCP1) формирование тепла и помогает снизить ожирение [51]. Снижение уровня стресса ЭПР химическими шаперонами TUDCA или 4-PBA стимулировало дифференцировку бежевых адипоцитов. У мышей с ожирением, получавших TUDCA, наблюдалось побурение (browning) белого жира, возможно, вызванное *транс*-дифференцировкой белых адипоцитов в бежевые, и значительно тормозилось увеличение веса [51].

По-видимому, противоречие в данных о роли стресса ЭПР в адипогенезе связано с тем, что разный уровень стресса ЭПР может по-разному влиять на адипогенез. Запуск стресса ЭПР выше физиологического уровня вызывает сильный UPR, который не позволяет клеткам уйти в дифференцировку, так как ресурсы таких клеток направлены на выживание. В связи с этим ряд исследователей предлагает выделять две формы UPR – острую форму, также называемую «патологической», и хроническую форму, которую они называют «физиологической» [39, 40, 45, 46]. Острая/патологическая форма UPR возникает в ответ на неблагоприятные условия, такие как гипоксия, гипергликемия, вирусная инфекция или окислительный и механический стресс из-за гипертрофии адипоцитов в жировой ткани при ожирении. Эта форма стресса ЭПР может отрицательно влиять на функцию жировой ткани и способствовать развитию диабета 2-го типа, резистентности к инсулину и лептину и липотоксичности. Напротив, хронический/физиологический тип активации UPR характерен для таких клеточных процессов, как дифференцировка и, по-видимому, является адаптивным механизмом, направленным на стимуляцию выживания клеток и эффективное функционирование ЭПР. Непосредственно в адипоцитах активация UPR, по-видимому, настраивает клетку на повышенную нагрузку в ЭПР [39].

Подтверждение предположения о двух формах UPR было получено в работе

Longo et al. [46], показавших, что стресс ЭПР и UPR «физиологически» активируются в ходе адипогенеза клеток 3T3-L1, а «патологическая» часть стресса ЭПР, вызванная глюкокотоксическим воздействием глюкозамина, ингибирует их дифференцировку. Индукция дифференцировки преадипоцитов в присутствии тапсигаргина вызвала значительно более высокую активацию UPR, чем при физиологически индуцированном адипогенезе. Такая гиперактивация UPR сопровождалась снижением экспрессии генов-маркёров адипоцитов (*C/EBP $\alpha$* , *PPAR $\gamma$ 2*, *FABP4/AP2*) и ингибированием адипогенеза. Сходным эффектом обладал и другой индуктор стресса ЭПР – глюкозамин, способный активировать гексозаминовый биосинтетический путь, вовлечённый во многие отрицательные эффекты гипергликемии. Интересно, что добавление химического шаперона 4-PBA в концентрации 50 мкМ вместе с глюкозамином в дифференцировочную среду не ингибировало «физиологическое» повышение экспрессии *GRP78* и *CHOP* при дифференцировке адипоцитов, но снимало ингибирующий эффект глюкозамина на адипогенез [46]. При этом ранее было показано, что 10–20 мМ 4-PBA ингибирует дифференцировку адипоцитов [39]. Как полагают Longo et al. [46], такое различие связано с тем, что в высокой концентрации 4-PBA полностью подавляет «физиологический» стресс ЭПР, необходимый для нормальной дифференцировки адипоцитов, в частности, для адаптации ЭПР к повышенному синтезу белка в ходе дифференцировки. В низкой концентрации этот химический шаперон ингибирует только «патологический» стресс ЭПР.

Таким образом, IRE1-, PERK- и ATF6-зависимые пути активации стресса ЭПР стимулируют адипогенез. Поэтому, например, для подавления адипогенеза и смягчения развития ожирения необходимо ингибировать все три пути.

### UPR И МИОГЕНЕЗ

Миобласты представляют собой клетки-предшественники мышечных волокон. В ходе ранней фазы эмбрионального развития миобласты, образовавшиеся из коммитированных предшественников, сливаются и формируют многоядерные миотубулы, а затем миотубулы дифференцируются в мышечные волокна [52]. Не ушедшие в дифференцировку коммитированные предшественники миобластов переходят в состояние покоя. На поздней стадии эмбриогенеза и в постнатальном развитии эти клетки остаются между базальной мембраной,

которая окружает мышечные волокна [53], и плазматической мембраной мышечных волокон (сарколеммой). Они представляют собой популяцию сателлитных клеток (миосателлитов) – стволовых клеток мышечной ткани [52, 54]. Миогенез в постнатальном периоде возобновляется в ходе регенерации ткани после повреждения мышечных волокон [55]. При этом сателлитные клетки активируются, пролиферируют и либо сливаются с мышечными волокнами, либо образуют новые мышечные волокна [56]. В активации дифференцировки миобластов и поддержании их пролиферативной активности участвуют белок детерминации миобластов 1 (MyoD) и миогенный фактор 5 (Myf5) [55]. После индукции дифференцировки миобласты перестают пролиферировать, и в них активируется экспрессия генов, кодирующих миогенин и специфичный для миоцитов энхансерный фактор 2с (Mef2c), что приводит к слиянию миобластов (миоцитов) и их терминальной дифференцировке. Миогенез сопровождается увеличением площади и объёма ЭПР, о чём свидетельствует хорошо развитая сеть ЭПР в миотубулах [52].

Известно, что первичные миобласты при индукции миогенеза *in vitro* могут дифференцироваться в миотубулы [54]. Оказалось, что физиологический стресс ЭПР стимулирует миогенез, причём для дифференцировки миобластов необходимы все три пути активации UPR [15, 52, 55, 57]. Кроме того, показано, что в ходе дифференцировки миобластов транскрипционный фактор TEAD4 (транскрипционно усиленный ассоциативный домен 4), экспрессирующийся в развивающейся скелетной мускулатуре эмбрионов мыши и необходимый для нормальной дифференцировки миобластов C2C12, также регулирует экспрессию генов UPR [57]. В частности, при нокдауне *TEAD4* снижается экспрессия генов шаперонов ЭПР, генов белков ERAD, *ATF6*, *ATF4* и *CHOP*, а также подавляется экспрессия и сплайсинг XBP1, причём экспрессия *CHOP* напрямую регулируется TEAD4.

В ходе дифференцировки миобластов происходит временное снижение концентрации кальция в ЭПР, необходимое для миогенеза [15, 55]. Блокирование освобождения кальция из ЭПР подавляет UPR в ходе миогенеза и ингибирует сам миогенез. Кроме того, снижение концентрации кальция в ЭПР в дифференцирующихся миобластах *in vitro* и *in vivo* приводит к образованию особых структур, выявляемых с помощью ЭПР-трекера. Эти структуры имеют размер 1–4 мкм и представляют собой цистерны гранулярного ЭПР, свёрнутые в концентрические кольца. Одна структура содержит 4–10



свёрнутых в кольцо цистерн ЭПР, расположенных почти на одинаковом расстоянии друг от друга. Они появляются в миобластах на третий день дифференцировки, а исчезают уже после слияния миобластов [15]. Сходные структуры, но со свободным пространством в центре (иногда заполненным органеллами), наблюдаются в пролиферирующих миобластах при индукции стресса ЭПР с помощью ингибиторов кальциевых АТФаз – тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты. Напротив, туникамицин, не влияющий на концентрацию кальция в ЭПР, не вызывает формирование таких структур [15]. Однако физиологическое значение таких конформационных изменений ЭПР остаётся неизвестным.

**Роль сигнального пути IRE1.** IRE1/XBP1 играет важную роль в поддержании выживаемости клеток и экспрессии генов, связанных с дифференцировкой миобластов [55]. В миобластах линии C2C12 нокдаун *IRE1* и *XBP1* подавляет формирование миотубул, экспрессию генов миогенеза – *Mef2c*, *MyoD* и гена, кодирующего миогенин [52, 55]. Следует отметить, что ген *XBP1* является прямой мишенью миогенина и *MyoD* [58]. В популяции клеток с нокдауном *XBP1* повышается частота апоптозов, что подчёркивает участие пути IRE1/XBP1 в поддержании выживания клеток путём стимуляции дифференцировки [55]. Более того, sXBP1, связываясь с промотором гена *CDK5*, участвует в регуляции экспрессии циклин-зависимой киназы 5 (*CDK5*), которая необходима для миогенеза. Было сделано предположение, что sXBP1 регулирует экспрессию генов миогенеза путём индукции экспрессии *CDK5* [55]. При этом гиперэкспрессия sXBP1 подавляет миогенез, активируя репрессор *MyoD* – *Mist1* [59]. В таких миобластах подавляется экспрессия маркёров миогенеза и нарушается формирование миотубул. Это может быть связано с тем, что гиперэкспрессия sXBP1 «имитирует» повышенный уровень стресса ЭПР, в связи с чем для восстановления гомеостаза срабатывает механизм ингибирования дифференцировки, то есть срабатывает «точка контроля стресса ЭПР» [55, 59].

Следует отметить, что нокаут *XBP1* не оказывает влияния на регенеративный миогенез с участием клеток-сателлитов у взрослых мышей [56]. Нокаут *XBP1* не влияет на формирование миотубул и мышечных волокон и на экспрессию маркёров миогенеза. Это может свидетельствовать о том, что разные миогенные факторы вносят вклад в эмбриональный миогенез и миогенез с участием клеток-сателлитов при регенерации во взрослом организме [55, 56]. Возможно, sXBP1 не оказывает влияния на регенеративный миогенез или

отсутствие этого транскрипционного фактора компенсируется другими факторами [55].

**Роль сигнального пути PERK.** PERK-опосредованный механизм контролирует раннюю дифференцировку миобластов *in vitro* за счёт регуляции экспрессии микроРНК, необходимых для миогенеза [52]. Нокдаун *PERK* в мышечных скелетных миобластах линии C2C12 подавляет образование миотубул, приводит к изменению морфологии миобластов, снижает экспрессию и синтез *MyoD*. При этом фармакологическое ингибирование *PERK* с помощью ингибитора фосфорилирования *PERK* GSK2606414 также приводит к подавлению синтеза *MyoD*. Более того, нокдаун *PERK* изменяет экспрессию микроРНК, связанных с поддержанием дифференцировки и стволовых свойств клеток. При нокдауне *PERK* экспрессия многих микроРНК, стимулирующих миогенез (например, miR-128), снижается, а экспрессия микроРНК, поддерживающих стволовые свойства клеток, повышается. Помимо этого, повышается активность сигнальных путей, ассоциированных со стволовыми свойствами клеток, таких как *Nanog*, *Myc* и *Oct4*, а также повышается экспрессия маркёра миосателлитов *PAX7* [52].

Более того, сигнальный путь PERK/ATF4 активирует микроРНК, ассоциированные с миогенезом на ранней стадии дифференцировки миобластов [52]. ATF4 связывается с промоторными участками и стимулирует экспрессию некоторых микроРНК, ассоциированных с дифференцировкой. При гиперэкспрессии ATF4 даже без стимула к дифференцировке миобласты сливаются в миотубулы, и в них повышается уровень синтеза *MyoD*.

Ключевой регулятор сигнального пути UPR – каталитическая субъединица протеинфосфатазы 1  $\gamma$  (*Ppp1cc*), ген которой является целевым для микроРНК miR-128, которую, в свою очередь, контролирует сигнальный путь PERK [52]. MiRNA-128 подавляет ингибитор миогенеза *Ppp1cc*, а репрессия *Ppp1cc* имеет решающее значение для петли обратной связи, которая регулирует активность сигнальных путей, связанных с UPR. Кроме этого, подавление активности *Ppp1cc* приводит к увеличению площади ЭПР, миграции клеток, их слиянию и образованию миотубул. При этом РНК-связывающий белок ARPP21 (регулируемый циклическими АМФ фосфопротеин 21) противодействует активности miR-128, конкурируя с ней за связывание с 3'-нетранслируемой областью гена, кодирующего *Ppp1cc*. В ходе позднего миогенеза ARPP21 негативно регулирует miR-128, подавляя её блокирующее воздействие на *Ppp1cc*, и таким образом, препятствуя постоянной активности UPR [52].



Помимо эмбрионального миогенеза, сигнальный путь PERK регулирует регенерацию скелетных мышц, опосредованную сателлитными клетками [56]. При нокауте *PERK in vivo* нарушается регенерация мышц, что выражается в подавлении формирования миотубул и мышечных волокон, снижении экспрессии и синтеза маркёров миогенеза *MyoD* и миогенина. Фармакологическое ингибирование PERK с помощью GSK2606414 в сателлитных клетках *in vitro* также приводит к подавлению формирования миотубул [56].

Следует отметить, что *СНОР*, напротив, подавляет транскрипцию *MyoD* и задерживает дифференцировку миобластов *in vitro* [60]. Экспрессия *СНОР* наблюдается в субпопуляции миобластов, которые при инкубации с дифференцировочной средой не уходят в дифференцировку. При нокауте *СНОР* наблюдается более ранняя и более выраженная дифференцировка, в миотубулах увеличивается количество ядер, в то время как постоянная экспрессия *СНОР* задерживает дифференцировку и уменьшает количество ядер в миотубулах. Показано, что *СНОР* связывается с регуляторными участками гена *MyoD* и снижает ацетилирование гистонов в этих участках. Таким образом, активность *СНОР*, по-видимому, препятствует преждевременной дифференцировке миобластов [60].

**Роль сигнального пути ATF6.** Проведённые исследования показали, что нокаут *ATF6* в мышечных скелетных миобластах линии C2C12 подавляет образование миотубул, экспрессию и синтез *MyoD* [52, 61]. Однако при регенеративном миогенезе с участием сателлитных клеток уровень экспрессии *ATF6* не изменяется [56]. По-видимому, роли разных сигнальных путей UPR в эмбриональном миогенезе и постнатальном регенеративном миогенезе различаются, однако для получения более детальной информации необходимы дополнительные исследования.

**Влияние индукторов стресса ЭПР на миогенез.** Индукторы стресса ЭПР, туникамицин и тапсигаргин, селективно элиминируют не способные дифференцироваться миобласты линии C2C12, позволяя выжившим клеткам более эффективно дифференцироваться в миотубулы [62, 63]. В частности, инкубация миобластов с туникамицином или тапсигаргином перед индукцией дифференцировки приводит к увеличению количества ядер в миотубулах и увеличению размера самих миотубул [62]. Такие миотубулы формируют саркомеры и способны сокращаться, что редко наблюдается в системе *in vitro* [62]. Инкубация миобластов с

тапсигаргином перед индукцией дифференцировки также повышает экспрессию генов, кодирующих *MyoD* и миогенин [63]. Более того, мягкий стресс ЭПР, индуцируемый тапсигаргином, устраняет подавление слияния миобластов линии C2C12, вызываемое гиперэкспрессией деубиквитирующего фермента USP19 [64].

Таким образом, все три пути активации UPR необходимы для нормального прохождения эмбрионального миогенеза, однако только сигнальный путь PERK стимулирует регенеративный миогенез.

## UPR И ОСТЕОБЛАСТОГЕНЕЗ

Остеобласты — это клетки, синтезирующие и образующие внеклеточный матрикс, и таким образом участвующие в формировании костной ткани [65, 66]. Они дифференцируются из преостеобластов, которые, в свою очередь, дифференцируются из мезенхимных стромальных (стволовых) клеток при активации мастер-регулятора остеогенеза *Runx2* (фактор транскрипции 2, связанный с доменом runt) [66]. Мишенями *Runx2* являются остеопонтин, остеокальцин (OCN) и костный сиалопротеин (BSP). Преостеобласты (незрелые остеобласты) дифференцируются в зрелые остеобласты в ходе трёх этапов: 1) преостеобласты продолжают пролиферировать и экспрессируют маркёры коллаген I, остеопонтин и др., 2) преостеобласты выходят из клеточного цикла и начинают дифференцироваться в остеобласты, экспрессируя маркёры коллаген I и активную щелочную фосфатазу, 3) незрелые остеобласты минерализуют матрикс и экспрессируют маркёр OCN [66]. Таким образом, когда незрелые остеобласты дифференцируются в зрелые, они продуцируют множество белков, в первую очередь коллаген I и OCN [67–69]. Для дифференцировки остеобластов необходимо множество факторов, среди которых ключевыми являются *Osx* (*Osterix*) и *BMP2* (костный морфогенетический белок 2) [66, 68]. Интересно, что *BMP2* стимулирует остеогенез путём активации мягкого стресса ЭПР с участием *IRE1*, *PERK* и *ATF6* [68, 70–72].

**Роль сигнального пути IRE1.** Роль пути *IRE1/XBP1* в дифференцировке остеобластов в настоящее время однозначно не определена. По данным одной группы исследователей, путь *IRE1/XBP1* стимулирует дифференцировку остеобластов, причём транскрипционный фактор *Osx*, необходимый для формирования костей, является мишенью *sXBP1* [73]. Так, например, при стимулировании остеогенной

дифференцировки с помощью BMP2 в фибробластах мыши MEF значительно повышается синтез sXBP1 и экспрессия *Osx*, синтез коллагена I и OCN, активность щелочной фосфатазы. В то же время при нокауте *IRE1* индукция дифференцировки с помощью BMP2 не вызывала повышения активности щелочной фосфатазы, был снижен уровень BSP, коллагена I и OCN, то есть при отсутствии *IRE1* дифференцировка остеобластов ингибировалась [73].

Противоположные результаты были получены другой группой исследователей, которые показали, что нокаунт *IRE1* стимулирует индуцированную BMP2 дифференцировку мезенхимных стволовых клеток линии C2C12 в остеобласты, а гиперэкспрессия *IRE1* ингибирует дифференцировку [74]. Противоречие в полученных данных можно объяснить тем, что в качестве модели остеогенеза были использованы разные клеточные линии, а также неполным подавлением экспрессии *IRE1* при его нокауне.

**Роль сигнального пути PERK.** В отличие от сигнального пути *IRE1* необходимость активности PERK для дифференцировки остеобластов не вызывает сомнений [67, 68, 75]. Мыши с нокаутом *PERK* имеют тяжёлую неонатальную остеопению, которая проявляется в уменьшении толщины кортикальной части кости и степени минерализации, а также в снижении объёма и толщины костных балок [67, 68]. Такая остеопения вызвана недостаточным количеством зрелых остеобластов, нарушенной дифференцировкой остеобластов и нарушением секреции проколлагена I. При нокауте *PERK* у мышей и в первичных остеобластах мышей снижается экспрессия генов, кодирующих маркёры зрелых остеобластов – щелочную фосфатазу, коллаген I, OCN и BSP, задерживается формирование минерализованных отложений, подавлена экспрессия *Runx2* и *Osx* [67, 68]. Напротив, при введении в первичные остеобласты мышей *PERK*<sup>-/-</sup> вектора с *ATF4* активность щелочной фосфатазы и формирование минерализованных отложений возвращается к нормальному уровню [68].

Активность PERK необходима для активации критического регулятора дифференцировки остеобластов – ATF4 [68, 75], который является транскрипционным фактором, необходимым для дифференцировки и экспрессии специфических генов остеобластов [75]. Кроме того, ATF4 участвует в посттранскрипционной регуляции синтеза коллагена I. У мышей с нокаутом *ATF4* развивается тяжёлая остеопения. В частности, задерживается формирование костей и минерализация в эмбриональный период, и снижается количество и толщина кост-

ных балок в ходе постнатального развития [75]. Мишенями ATF4 являются маркёры дифференцировки остеобластов OCN и BSP [68, 75]. ATF4 активирует OCN, формируя на промоторе *OCN* комплекс с *Runx2* [68, 76]. Следует отметить, что *Runx2* нужен для экспрессии самого ATF4, так как при отсутствии экспрессии *Runx2* экспрессия *ATF4* подавлена [75].

ATF4 является транскрипционным активатором не только для OCN, но и для гена транскрипционного фактора остеогенеза *Osx* [77]. ATF4 повышает экспрессию *Osx*, связываясь с его промотором. Нокаут *ATF4* приводит к значительному снижению уровня синтеза *Osx*, хотя уровень *Runx2*, необходимый для экспрессии *Osx*, не изменяется.

Интересно, что паратиреоидный гормон (ПТГ), используемый в клинике в качестве лекарственного препарата для лечения возрастного остеопороза, воздействует на сигнальный путь PERK и стимулирует формирование костей [69, 77]. ПТГ активирует PERK в преостеобластах линии MC3T3-E1 и в первичных остеобластах голени и стимулирует активацию генов-маркёров дифференцировки остеобластов, таких как *Runx2*, *OCN* и гены, кодирующие щелочную фосфатазу и коллаген I [69]. Подавление активности PERK или ATF4 с помощью ингибиторов или нокауна подавляет экспрессию генов-маркёров дифференцировки остеобластов, активность щелочной фосфатазы, минерализацию матрикса и секрецию OCN в этих клетках. Напротив, салубринал, поддерживающий фосфорилирование eIF2 $\alpha$ , усиливает дифференцировку остеобластов, индуцированную с помощью ПТГ. Кроме того, было показано, что ПТГ усиливает взаимодействие между шапероном HSP90 (белок теплового шока 90) и PERK, а ингибирование HSP90 снижает синтез PERK и ингибирует дифференцировку остеобластов при воздействии ПТГ. Таким образом, HSP90 также необходим для дифференцировки остеобластов, так как он усиливает стабильность PERK [69]. Участие сигнального пути PERK в активации остеогенеза с помощью ПТГ было подтверждено в экспериментах *in vivo*. У мышей с нокаутом *ATF4* ПТГ не индуцировал или слабо индуцировал экспрессию маркёров дифференцировки остеобластов [77].

Следует отметить, что путь PERK стимулирует остеогенную дифференцировку не только остеобластов, но и других клеток мезенхимного происхождения. При индукции остеогенной дифференцировки стандартной дифференцировочной средой (питательная среда  $\alpha$ -MEM с добавлением 10% FBS, 100 мкМ L-аскор-

бат-2-фосфата, 10 мМ β-глицерофосфата и 10 нМ дексаметазона) стволовые клетки периодонтальной связки человека (плотная соединительная ткань вокруг корня и альвеолярной кости зуба) дифференцируются в остеобластоподобные клетки, в них повышается экспрессия генов-маркёров остеогенной дифференцировки [78]. Гиперэкспрессия *PERK* ещё больше повышает уровень экспрессии генов-маркёров остеогенной дифференцировки и активность щелочной фосфатазы, а подавление *PERK*, напротив, ингибирует дифференцировку.

Кроме того, *ATF4* играет ключевую роль в индукции дифференцировки мезенхимных стволовых клеток костного мозга в остеобласты, в том числе стимулируя синтез β-катенина, который необходим для дифференцировки в остеобласты [79]. Подавление экспрессии гена, кодирующего *ATF4*, ингибировало дифференцировку в остеобласты. Нокдаун *ATF4* снижал уровень синтеза β-катенина, но не экспрессии гена, кодирующего β-катенин, что свидетельствует о преимущественно посттранскрипционной регуляции уровня β-катенина. Помимо этого, *ATF4* индуцирует признаки остеогенной дифференцировки в фибробластах *N1H3T3*, миобластах *C2C12* и лимфоцитах *S194* [65].

**Роль сигнального пути *ATF6*.** Исследования показали, что в остеогенезе, индуцируемом фактором дифференцировки *BMP2*, участвует и *ATF6* [71]. *BMP2* стимулирует экспрессию и активацию *ATF6* в клетках линии *MC3T3-E1*, усиливая связывание *Runx2* с промотором гена *ATF6*. При нокауте *Runx2* *BMP2* не способен активировать *ATF6*. В свою очередь, гиперэкспрессия *ATF6* повышает активность промотора гена *OCN*, а ингибирование активности *ATF6* блокирует индукцию экспрессии *OCN*. По-видимому, *BMP2* индуцирует дифференцировку остеобластов через *Runx2*-зависимую экспрессию *ATF6*, который напрямую регулирует транскрипцию *OCN* [71]. Интересно, что гомолог *ATF6* – *OASIS* (вещество, специфически индуцируемое старыми остеобластами), экспрессирующийся в костях, не влияет на экспрессию *OCN*, однако является транскрипционным активатором гена, кодирующего коллаген I, и имеет сайт связывания на его промоторе [70]. У мышей, нокаутных по *OASIS*, наблюдается сильная остеопения из-за задержки дифференцировки остеобластов, характеризующаяся в том числе снижением отложения коллагена I.

**Влияние индукторов стресса ЭПР на остеогенез.** При запуске физиологического стресса ЭПР индукторы стресса ЭПР могут стимулировать остеогенез [80, 81]. Так, например,

в первичных остеобластах мыши и мезенхимных стволовых клетках костного мозга крысы тапсигаргин повышает уровни синтеза *OCN* и *BSP*, а при нокауте *PERK* в первичных остеобластах и при нокауте *PERK* в мезенхимных стволовых клетках костного мозга крысы данный эффект не наблюдается [68, 81].

При этом повышенный (патологический) стресс ЭПР подавляет остеогенез и индуцирует апоптоз [80–82]. Так, тапсигаргин стимулирует остеогенез в линии стромальных клеток костного мозга мыши *ST2* [82]. Однако следует отметить, что использование более высокой дозы тапсигаргина подавляет остеогенез [81].

Таким образом, все три пути активации *UPR* стимулируют остеогенез, что может быть использовано для улучшения восстановления костной ткани.

## UPR И ОСТЕОКЛАСТОГЕНЕЗ

Остеокласты – тканеспецифичные многоядерные макрофаги, дифференцирующиеся из моноцитарных/макрофагальных предшественников на поверхности или около поверхности кости [83]. Они играют важную роль в резорбции и ремоделировании кости, и их активность тщательно регулируется гормонами и цитокинами для того, чтобы обеспечить баланс между резорбцией кости и её формированием [84]. Нарушение этого баланса в сторону избыточной резорбции ведёт к таким патологиям, как остеопороз, метастазирование в костях, разрушение костей при артрите и периодонтит [84, 85]. Дифференцировка остеокластов запускается связыванием рецептора-активатора ядерного фактора *NF-κB* (*RANK*), расположенного на поверхности предшественников остеокластов, с лигандом *RANK* (*RANKL*), расположенным на поверхности остеобластов и остеоцитов [83, 84]. После связывания с лигандом *RANK* активирует различные сигнальные пути, а также индуцирует колебания внутриклеточной концентрации кальция, что ведёт к активации транскрипционных факторов остеокластогенеза, таких как протоонкоген *c-Fos* и ядерный фактор активированных T-клеток, цитоплазматический 1 (*NFATc1*) [84]. Исследования последних лет показали, что в дифференцировке остеокластов важную роль играют сигнальные пути *UPR*, а именно: ветви *IRE1/XBP1* и *PERK/eIF2*.

**Роль сигнального пути *IRE1*.** В ходе остеокластогенеза *in vitro*, индуцированного с помощью рекомбинантного *RANKL* и колониестимулирующего фактора 1 (*CSF1*) мыши, путь *IRE1/XBP1* активируется в начале дифферен-



цировки, достигает пика активности на второй день после индукции остеокластогенеза, а затем инактивируется [84]. Подавление IRE1/XBP1 значительно репрессирует остеокластогенез, что ведёт к уменьшению числа остеокластов и увеличению костной массы *in vivo*. Это связано с тем, что sXBP1 является транскрипционным фактором мастер-регулятора остеокластогенеза NFATc1 и стимулирует его транскрипцию, непосредственно связываясь с промотором гена *NFATc1*. Подавление IRE1/XBP1 ведёт к супрессии транскрипции *NFATc1* и остеокластогенеза. При этом подавление IRE1 не влияет на экспрессию других транскрипционных факторов дифференцировки остеокластов [84]. Предполагается, что путь IRE1/XBP1 при остеокластогенезе активируется из-за физиологического стресса ЭПР, косвенно вызываемого колебаниями концентрации кальция, как следствие сигналинга RANKL–RANK. Активация IRE1/XBP1, в свою очередь, стимулирует транскрипцию *NFATc1* [84].

Следует отметить, что внеклеточные везикулы из клеток множественной миеломы индуцируют остеокластогенез в кости путём активации механизма IRE1/XBP1, что ведёт к заболеваниям костей, которыми страдают более 70% пациентов с множественной миеломой [86]. Сигнальные молекулы UPR (например, GRP94 и GRP78) являются карго для внеклеточных везикул клеток множественной миеломы, и поглощение таких везикул макрофагами мыши Raw264.7 быстро запускает фосфорилирование IRE1, сплайсинг XBP1 и активацию транскрипции *NFATc1*. Соответственно, подавление в макрофагах мыши пути IRE1/XBP1 с помощью селективного ингибитора IRE1 GSK2850163 при одновременном введении в культуральную среду внеклеточных везикул из клеток множественной миеломы ингибирует экспрессию *NFATc1* и препятствует дифференцировке макрофагов в остеокласты. При этом подавляется и резорбционная активность таких макрофагов [86].

**Роль сигнального пути PERK.** RANKL-индуцированный остеокластогенез сопровождается активацией пути PERK. Ингибирование PERK с помощью GSK2606414 подавляет формирование остеокластов и их резорбционную активность, в том числе при моделировании остеопороза у мышей [85]. Кроме того, ATF4 является транскрипционным активатором для *NFATc1*. Остеокластогенез подавляется при нокауте *ATF4 in vitro* и *in vivo* и усиливается при искусственном повышении экспрессии *ATF4* [87]. Предположительно, активатором физиологического стресса ЭПР,

стимулирующего остеокластогенез, а точнее, активатором PERK, является окислительный стресс [85].

**Влияние индукторов стресса ЭПР на остеокластогенез.** Участие стресса ЭПР в остеокластогенезе наводит на мысль о возможности стимулировать дифференцировку остеокластов с помощью индукторов стресса ЭПР. Действительно, показано, что индуктор стресса ЭПР, тапсигаргин, может запускать остеокластогенез, активируя экспрессию и синтез NFATc1 и маркёров остеокластов [88, 89]. При этом химический шаперон и ингибитор стресса ЭПР, 4-PBA, подавляет остеокластогенез и активацию NFATc1 как в присутствии тапсигаргина, так и без него [89]. Кроме того, 4-PBA подавляет остеокластогенез, индуцированный частицами полиэтилена (средний диаметр частиц 65 нм), которые также активируют стресс ЭПР [90]. Такролимус (иммуносупрессирующее соединение, блокирующее активацию T-клеток при ревматоидном артрите) ингибирует стимулированный тапсигаргином стресс ЭПР и остеокластогенез, подавляя экспрессию *NFATc1* [91]. Другой индуктор стресса ЭПР, туникамицин, также стимулирует остеокластогенез, индуцируя экспрессию маркёров остеокластов [88].

Примечательно то, что 0,05 и 0,1 нМ тапсигаргин стимулируют остеокластогенез, в то время как тапсигаргин в концентрации 0,2 нМ не оказывает влияния на остеокластогенез [85]. Это свидетельствует о том, что остеокластогенез стимулируется только определёнными уровнями стресса ЭПР. Это предположение подтверждают данные о влиянии салубринала на дифференцировку остеокластов [92]. Салубринал повышает фосфорилирование и, как следствие, инактивацию eIF2 $\alpha$ , что снижает общий синтез белков, включая NFATc1, и подавляет дифференцировку остеокластов из клеток костного мозга мыши [92, 93]. Кроме того, салубринал смягчает признаки остеопороза в мышечной модели остеопороза [93]. Возможно, салубринал индуцирует слишком сильный стресс ЭПР, что приводит не к стимуляции дифференцировки, а к её подавлению.

Таким образом, сигнальные пути, активируемые IRE1 и PERK, стимулируют остеокластогенез. В связи с этим для подавления остеокластогенеза необходимо ингибировать оба этих пути.

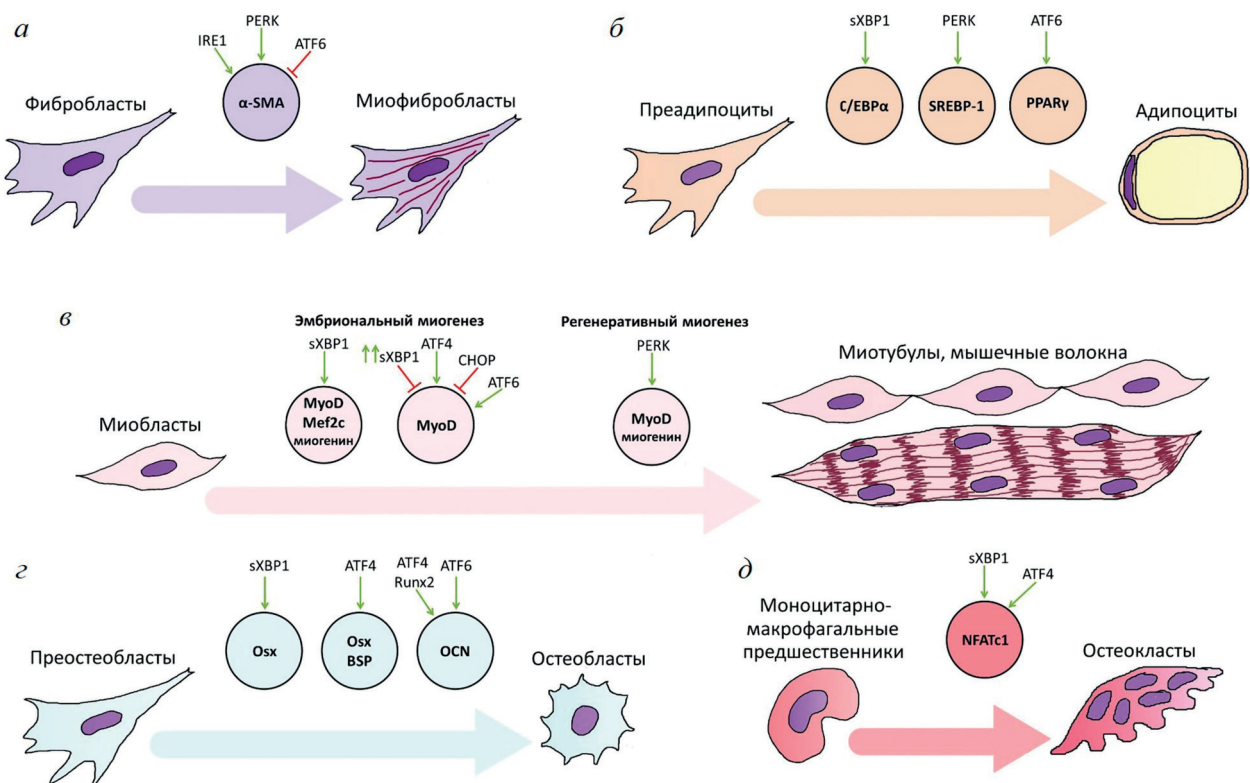
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация стресса ЭПР и UPR являются необходимыми условиями для дифференцировки



фибробластов в миофибробласты, а также для дифференцировки клеток в ходе адипогенеза, миогенеза, остеобластогенеза и остеокластогенеза (рис. 2). По-видимому, именно хронический/физиологический стресс ЭПР стимулирует дифференцировку этих клеток, в то время как острый/патологический стресс ЭПР ингибирует дифференцировку и может запускать гибель клеток. Как видно из рис. 2, все три сигнальных пути UPR стимулируют адипогенез, эмбриональный миогенез и остеобластогенез. Дифференцировка фибробластов в миофибробласты стимулируется сигнальными путями IRE1 и PERK, а сигнальный путь с участием ATF6 подавляет дифференцировку. В регенеративном миогенезе обнаружено участие только сигнального пути PERK, что сви-

детельствует о различии в регуляции миогенеза в эмбриональном и постнатальном периоде и потенциальной возможности контролировать регенерацию мышечной ткани, регулируя активность этого сенсора стресса ЭПР. Интересно, что некоторые компоненты UPR являются транскрипционными факторами, активирующими экспрессию генов-маркёров дифференцировки. Например, sXBP1 связывается с промотором транскрипционного фактора адипогенеза *C/EBP $\alpha$*  и фактора остеобластогенеза *Osx*, а ATF4 является транскрипционным фактором для *Osx* и маркёра остеобластогенеза *OCN*. Пока неясно, является ли UPR индуктором дифференцировки клеток мезенхимного происхождения или же UPR запускается в процессе дифференцировки, например, из-за по-



**Рис. 2.** Роль различных путей стресса ЭПР (IRE1, PERK, ATF6) в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения. Дифференцировка фибробластов, преадипоцитов, миобластов, преостеобластов и моноцитарно-макрофагальных предшественников в более зрелые формы сопровождается активацией стресса ЭПР и обозначена стрелками соответствующих цветов. В кружках таких же цветов приведены названия маркёров дифференцировки для каждого типа клеток. Зелёными стрелками обозначена стимуляция синтеза маркёров дифференцировки сенсорами или участниками сигнальных каскадов UPR, красными линиями – подавление синтеза. *a* – Дифференцировка фибробластов в миофибробласты; *б* – дифференцировка преадипоцитов в адипоциты; *в* – дифференцировка миобластов в миотубулы и мышечные волокна (различия в эмбриональном и регенеративном миогенезах); *г* – дифференцировка преостеобластов в остеобласты; *д* – дифференцировка моноцитарно-макрофагальных предшественников в остеокласты. Сокращения: ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4; ATF6 – активирующий фактор транскрипции 6; BSP – костный сиалопротеин; C/EBP $\alpha$  – ССААТ/энхансер-связывающий белок  $\alpha$ ; CHOP – ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку; IRE1 – требующий инозитол белок 1; Mef2c – специфичный для миоцитов энхансерный фактор 2c; Myf5 – миогенный фактор 5; MyoD – белок детерминации миобластов 1; NFATc1 – ядерный фактор активированных Т-клеток, цитоплазматический 1; OCN – остеокальцин; Osx – транскрипционный фактор Osterix; PERK – киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA; PPAR $\gamma$  – рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом  $\gamma$ ; Runx2 – фактор транскрипции 2, связанный с доменом runt;  $\alpha$ -SMA – гладкомышечный актин  $\alpha$ ; SREBP-1 – белок, связывающийся с регуляторным элементом стерола-1; sXBP1 – сплайсированный X-box-связывающий белок 1

вышенного синтеза секреторных белков. Следует отметить, что усиление или подавление дифференцировки может играть критическую роль, внося вклад в развитие многих заболеваний. Так, например, избыточная дифференцировка фибробластов, адипоцитов и остеокластов вызывает фиброз, ожирение и остеопороз. Фиброз в настоящее время вызывает особый интерес, так как является одним из основных последствий COVID-19. Изучение механизмов участия UPR в дифференцировке клеток и способов влияния на сигнальные пути UPR открывает перспективы для поиска препаратов, позволяющих тонко регулировать и даже перенастраивать процессы, разбалансированные при нарушениях развития организма или возникновении патологических состояний.

**Вклад авторов.** Е.П. Турищева – работа с литературой и написание текста статьи; М.С. Вильданова – авторство рисунков; Е.А. Смирнова, Г.Е. Онищенко – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Osowski, C. M., and Urano, F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Method. Enzymol.*, **490**, 71-92, doi: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0.
2. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., and Igarria, A. (2020) A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems, *FEBS J.*, **287**, 27-42, doi: 10.1111/febs.15107.
3. Hwang, J., and Qi, L. (2018) Quality control in the endoplasmic reticulum: crosstalk between ERAD and UPR pathways, *TiBS*, **43**, 593-605, doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.
4. Fregno, I., and Molinari, M. (2019) Proteasomal and lysosomal clearance of faulty secretory proteins: ER-associated degradation (ERAD) and ER-to-lysosome-associated degradation (ERLAD) pathways, *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, **54**, 153-163, doi: 10.1080/10409238.2019.1610351.
5. Chadwick, S. R., and Lajoie, P. (2019) Endoplasmic reticulum stress coping mechanisms and lifespan regulation in health and diseases, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 84, doi: 10.3389/fcell.2019.00084.
6. Liu, E. S., Ou, J. H., and Lee, A. S. (1992) Brefeldin A as a regulator of *grp78* gene expression in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 7128-7133, doi: 10.1016/S0021-9258(19)50547-6.
7. Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K. I., Nakamura, K. I., Inoue, R., et al. (2006) Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells, *Neurochem. Int.*, **48**, 696-702, doi: 10.1016/j.neuint.2005.12.012.
8. Li, B., Yi, P., Zhang, B., Xu, C., Liu, Q., et al. (2011) Differences in endoplasmic reticulum stress signalling kinetics determine cell survival outcome through activation of MKP-1, *Cell. Signal.*, **23**, 35-45, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.07.019.
9. Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2017) Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate, *Front. Oncol.*, **7**, 78, doi: 10.3389/fonc.2017.00078.
10. Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., et al. (2019) Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications, *FEBS J.*, **286**, 241-278, doi: 10.1111/febs.14608.
11. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89-102, doi: 10.1038/nrm3270.
12. Oakes, S. A., and Papa, F. R. (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology, *Annu. Rev. Pathol.*, **10**, 173-194, doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
13. Celli, A., Mackenzie, D. S., Crumrine, D. S., Tu, C. L., Hupe, M., et al. (2011) Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion activates XBP1 and controls terminal differentiation in keratinocytes and epidermis, *Brit. J. Dermatol.*, **164**, 16-25, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10046.x.
14. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., et al. (2015) Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts, *PLoS One*, **10**, e0123578, doi: 10.1371/journal.pone.0123578.
15. Nakanishi, K., Kakiguchi, K., Yonemura, S., Nakano, A., and Morishima, N. (2015) Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation, *FASEB J.*, **29**, 2137-2149, doi: 10.1096/fj.14-261529.

16. Muraio, N., and Nishitoh, H. (2017) Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system, *J. Biochem.*, **162**, 155-162, doi: 10.1093/jb/mvx047.
17. Vildanova, M., Saidova, A., Fokin, A., Potashnikova, D., Onishchenko, G., et al. (2019) Jasmonic acid induces endoplasmic reticulum stress with different outcome in cultured normal and tumor epidermal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1289-1300, doi: 10.1134/S0320972519090070.
18. Vildanova, M., Vishnyakova, P., Saidova, A., Konduktorova, V., Onishchenko, G., et al. (2021) Gibberellic acid initiates ER stress and activation of differentiation in cultured human immortalized keratinocytes HaCaT and epidermoid carcinoma cells A431, *Pharmaceutics*, **13**, 1813, doi: 10.3390/pharmaceutics13111813.
19. Турищева Е. П., Вильданова М. С., Поташникова Д. М., Смирнова Е. А. (2020) Различная реакция биосинтетической системы дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы человека на действие растительных гормонов, *Цитология*, **62**, 566-580, doi: 10.31857/S0041377120080088.
20. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., et al. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature*, **415**, 92-96, doi: 10.1038/415092a.
21. Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., and Glimcher, L. H. (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 7448-7459, doi: 10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003.
22. Lam, W. Y., and Bhattacharya, D. (2018) Metabolic links between plasma cell survival, secretion, and stress, *Trends Immunol.*, **39**, 19-27, doi: 10.1016/j.it.2017.08.007.
23. Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., et al. (2011) The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4390-4405, doi: 10.1091/mbc.e11-06-0510.
24. Gardner, B. M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C. M., and Walter, P. (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a013169, doi: 10.1101/cshperspect.a013169.
25. Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins: involvement of basic leucine zipper transcription factors, *J. Biol. Chem.*, **273**, 33741-33749, doi: 10.1074/jbc.273.50.33741.
26. Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., et al. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Mol. Cell*, **6**, 1355-1364, doi: 10.1016/S1097-2765(00)00133-7.
27. Kendall, R. T., and Feghali-Bostwick, C. A. (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, *Front. Pharmacol.*, **5**, 123, doi: 10.3389/fphar.2014.00123.
28. Desai, V. D., Hsia, H. C., and Schwarzbauer, J. E. (2014) Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **9**, e86865, doi: 10.1371/journal.pone.0086865.
29. Heindryckx, F., Binet, F., Ponticos, M., Rombouts, K., Lau, J., et al. (2016) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1 $\alpha$ -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 729-744, doi: 10.15252/emmm.201505925.
30. Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D. K., Minoo, P., Liu, Y., et al. (2011) Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein, *Am. J. Resp. Cell Mol.*, **45**, 498-509, doi: 10.1165/rcmb.2010-0347OC.
31. Baek, H. A., Kim, D. S., Park, H. S., Jang, K. Y., Kang, M. J., et al. (2012) Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts, *Am. J. Resp. Cell Mol.*, **46**, 731-739, doi: 10.1165/rcmb.2011-0121OC.
32. Chen, Y. C., Chen, B. C., Huang, H. M., Lin, S. H., and Lin, C. H. (2019) Activation of PERK in ET-1-and thrombin-induced pulmonary fibroblast differentiation: Inhibitory effects of curcumin, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 15977-15988, doi: 10.1002/jcp.28256.
33. Jiang, S., He, R., Zhu, L., Liang, T., Wang, Z., et al. (2018) Endoplasmic reticulum stress-dependent ROS production mediates synovial myofibroblastic differentiation in the immobilization-induced rat knee joint contracture model, *Exp. Cell Res.*, **369**, 325-334, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.036.
34. Qin, X., Lin, X., Liu, L., Li, Y., Li, X., et al. (2021) Macrophage-derived exosomes mediate silica-induced pulmonary fibrosis by activating fibroblast in an endoplasmic reticulum stress-dependent manner, *J. Cell. Mol. Med.*, **25**, 4466-4477, doi: 10.1111/jcmm.16524.
35. Song, M., Peng, H., Guo, W., Luo, M., Duan, W., et al. (2019) Cigarette smoke extract promotes human lung myofibroblast differentiation by the induction of endoplasmic reticulum stress, *Respiration*, **98**, 347-356, doi: 10.1159/000502099.
36. Stauffer, W. T., Blackwood, E. A., Azizi, K., Kaufman, R. J., and Glembotski, C. C. (2020) The ER unfolded protein response effector, ATF6, reduces cardiac fibrosis and decreases activation of cardiac fibroblasts, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1373, doi: 10.3390/ijms21041373.
37. Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J. W. (2004) XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the



- endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.*, **167**, 35-41, doi: 10.1083/jcb.200406136.
38. Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., and Pepper, M. S. (2013) Adipocyte and adipogenesis, *Eur. J. Cell Biol.*, **92**, 229-236, doi: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001.
  39. Basseri, S., Lhoták, Š., Sharma, A. M., and Austin, R. C. (2009) The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response, *J. Lipid Res.*, **50**, 2486-2501, doi: 10.1194/jlr.M900216-JLR200.
  40. Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., et al. (2009) The IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis, *Cell Metab.*, **9**, 556-564, doi: 10.1016/j.cmet.2009.04.009.
  41. Batchvarova, N., Wang, X. Z., and Ron, D. (1995) Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153), *EMBO J.*, **14**, 4654-4661, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00147.x.
  42. Shimada, T., Hiramatsu, N., Okamura, M., Hayakawa, K., Kasai, A., et al. (2007) Unexpected blockade of adipocyte differentiation by K-7174: implication for endoplasmic reticulum stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 355-360, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.167.
  43. Bobrovnikova-Marjon, E., Hatzivassiliou, G., Grigoriadou, C., Romero, M., Cavener, D. R., et al. (2008) PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16314-16319, doi: 10.1073/pnas.0808517105.
  44. Bobrovnikova-Marjon, E., Pytel, D., Riese, M. J., Vaites, L. P., Singh, N., et al. (2012) PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 2268-2278, doi: 10.1128/MCB.00063-12.
  45. Han, J., Murthy, R., Wood, B., Song, B., Wang, S., et al. (2013) ER stress signalling through eIF2 $\alpha$  and CHOP, but not IRE1 $\alpha$ , attenuates adipogenesis in mice, *Diabetologia*, **56**, 911-924, doi: 10.1007/s00125-012-2809-5.
  46. Longo, M., Spinelli, R., D'Esposito, V., Zatterale, F., Fiory, F., et al. (2016) Pathologic endoplasmic reticulum stress induced by glucotoxic insults inhibits adipocyte differentiation and induces an inflammatory phenotype, *BBA-Mol. Cell Res.*, **1863**, 1146-1156, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.019.
  47. Kang, S. U., Kim, H. J., Kim, D. H., Han, C. H., Lee, Y. S., et al. (2018) Nonthermal plasma treated solution inhibits adipocyte differentiation and lipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes via ER stress signal suppression, *Sci. Rep.*, **8**, 1-12, doi: 10.1038/s41598-018-20768-5.
  48. Lowe, C. E., Dennis, R. J., Obi, U., O'Rahilly, S., and Rochford, J. J. (2012) Investigating the involvement of the ATF6 $\alpha$  pathway of the unfolded protein response in adipogenesis, *Int. J. Obesity*, **36**, 1248-1251, doi: 10.1038/ijo.2011.233.
  49. Mohan, S., Brown, L., and Ayyappan, P. (2019) Endoplasmic reticulum stress: a master regulator of metabolic syndrome, *Eur. J. Pharmacol.*, **860**, 172553, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172553.
  50. Carlson, S. G., Fawcett, T. W., Bartlett, J. D., Bernier, M., and Holbrook, N. J. (1993) Regulation of the C/EBP-related gene gadd153 by glucose deprivation, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4736-4744, doi: 10.1128/mcb.13.8.4736-4744.1993.
  51. Lee, J. M., Park, S., Lee, D., Ginting, R. P., Lee, M. R., et al. (2021) Reduction in endoplasmic reticulum stress activates beige adipocytes differentiation and alleviates high fat diet-induced metabolic phenotypes, *BBA-Mol. Basis Dis.*, **1867**, 166099, doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166099.
  52. Tan, Y. Y., Zhang, Y., Li, B., Ou, Y. W., Xie, S. J., et al. (2021) PERK signaling controls myoblast differentiation by regulating microRNA networks, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 670435, doi: 10.3389/fcell.2021.670435.
  53. Chal, J., and Pourquié, O. (2017) Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*, *Development*, **144**, 2104-2122, doi: 10.1242/dev.151035.
  54. Sincennes, M. C., Brun, C. E., and Rudnicki, M. A. (2016) Concise review: epigenetic regulation of myogenesis in health and disease, *Stem Cells Transl. Med.*, **5**, 282-290, doi: 10.5966/sctm.2015-0266.
  55. Tokutake, Y., Yamada, K., Hayashi, S., Arai, W., Watanabe, T., et al. (2020) IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required during early differentiation of C2C12 myoblasts, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 182, doi: 10.3390/ijms21010182.
  56. Xiong, G., Hindi, S. M., Mann, A. K., Gallot, Y. S., Bohnert, K. R., et al. (2017) The PERK arm of the unfolded protein response regulates satellite cell-mediated skeletal muscle regeneration, *Elife*, **6**, e22871, doi: 10.7554/eLife.22871.
  57. Benhaddou, A., Keime, C., Ye, T., Morlon, A., Michel, I., et al. (2012) Transcription factor TEAD4 regulates expression of myogenin and the unfolded protein response genes during C2C12 cell differentiation, *Cell Death Differ.*, **19**, 220-231, doi: 10.1038/cdd.2011.87.
  58. Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sharan, R., Kluger, Y., et al. (2005) An initial blueprint for myogenic differentiation, *Gene Dev.*, **19**, 553-569, doi: 10.1101/gad.1281105.
  59. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., et al. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks, *Mol. Cell*, **27**, 53-66, doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.011.
  60. Alter, J., and Bengal, E. (2011) Stress-induced C/EBP homology protein (CHOP) represses MyoD transcription to delay myoblast differentiation, *PLoS One*, **6**, e29498, doi: 10.1371/journal.pone.0029498.



61. Nakanishi, K., Sudo, T., and Morishima, N. (2005) Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development, *J. Cell Biol.*, **169**, 555-560, doi: 10.1083/jcb.200412024.
62. Nakanishi, K., Dohmae, N., and Morishima, N. (2007) Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro, *FASEB J.*, **21**, 2994-3003, doi: 10.1096/fj.06-6408com.
63. Wei, Y., Tao, X., Xu, H., Chen, Y., Zhu, L., et al. (2016) Role of miR-181a-5p and endoplasmic reticulum stress in the regulation of myogenic differentiation, *Gene*, **592**, 60-70, doi: 10.1016/j.gene.2016.07.056.
64. Wiles, B., Miao, M., Coyne, E., Larose, L., Cybulsky, A. V., et al. (2015) USP19 deubiquitinating enzyme inhibits muscle cell differentiation by suppressing unfolded-protein response signaling, *Mol. Biol. Cell*, **26**, 913-923, doi: 10.1091/mbc.E14-06-1129.
65. Yang, X., and Karsenty, G. (2004) ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 47109-47114, doi: 10.1074/jbc.M410010200.
66. Rutkovskiy, A., Stenslökken, K. O., and Vaage, I. J. (2016) Osteoblast differentiation at a glance, *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, **22**, 95-106, doi: 10.12659/MSMBR.901142.
67. Wei, J., Sheng, X., Feng, D., McGrath, B., and Cavener, D. R. (2008) PERK is essential for neonatal skeletal development to regulate osteoblast proliferation and differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **217**, 693-707, doi: 10.1002/jcp.21543.
68. Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., et al. (2011) Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4809-4818, doi: 10.1074/jbc.M110.152900.
69. Zhang, K., Wang, M., Li, Y., Li, C., Tang, S., et al. (2019) The PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 signaling branch regulates osteoblast differentiation and proliferation by PTH, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, E590-E604, doi: 10.1152/ajpendo.00371.2018.
70. Murakami, T., Saito, A., Hino, S. I., Kondo, S., Kanemoto, S., et al. (2009) Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1205-1211, doi: 10.1038/ncb1963.
71. Jang, W. G., Kim, E. J., Kim, D. K., Ryoo, H. M., Lee, K. B., et al. (2012) BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription, *J. Biol. Chem.*, **287**, 905-915, doi: 10.1074/jbc.M111.253187.
72. Son, H. E., Kim, E. J., and Jang, W. G. (2018) Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells, *Life Sci.*, **193**, 34-39, doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.008.
73. Tohmonda, T., Miyauchi, Y., Ghosh, R., Yoda, M., Uchikawa, S., et al. (2011) The IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix, *EMBO Rep.*, **12**, 451-457, doi: 10.1038/embor.2011.34.
74. Guo, F. J., Jiang, R., Xiong, Z., Xia, F., Li, M., et al. (2014) IRE1 $\alpha$  constitutes a negative feedback loop with BMP2 and acts as a novel mediator in modulating osteogenic differentiation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1239, doi: 10.1038/cddis.2014.194.
75. Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H. C., et al. (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: implication for Coffin-Lowry syndrome, *Cell*, **117**, 387-398, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00344-7.
76. Xiao, G., Jiang, D., Ge, C., Zhao, Z., Lai, Y., et al. (2005) Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression, *J. Biol. Chem.*, **280**, 30689-30696, doi: 10.1074/jbc.M500750200.
77. Yu, S., Franceschi, R. T., Luo, M., Fan, J., Jiang, D., et al. (2009) Critical role of activating transcription factor 4 in the anabolic actions of parathyroid hormone in bone, *PLoS One*, **4**, e7583, doi: 10.1371/journal.pone.0007583.
78. Yang, S., Hu, L., Wang, C., and Wei, F. (2020) PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 signaling contributes to osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells, *J. Mol. Histol.*, **51**, 125-135, doi: 10.1007/s10735-020-09863-y.
79. Yu, S., Zhu, K., Lai, Y., Zhao, Z., Fan, J., et al. (2013) ATF4 promotes  $\beta$ -catenin expression and osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, *Int. J. Biol. Sci.*, **9**, 256-266, doi: 10.7150/ijbs.5898.
80. Jang, W. G., Kim, E. J., and Koh, J. T. (2011) Tunicamycin negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation through CREBH expression in MC3T3E1 cells, *BMB Rep.*, **44**, 735-740, doi: 10.5483/BMBRep.2011.44.11.735.
81. Shi, M., Song, W., Han, T., Chang, B., Li, G., et al. (2017) Role of the unfolded protein response in topography-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Acta Biomater.*, **54**, 175-185, doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.018.
82. Tanaka, K. I., Yamaguchi, T., Kaji, H., Kanazawa, I., and Sugimoto, T. (2013) Advanced glycation end products suppress osteoblastic differentiation of stromal cells by activating endoplasmic reticulum stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **438**, 463-467, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.126.
83. Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation, *Nature*, **423**, 337-342, doi: 10.1038/nature01658.
84. Tohmonda, T., Yoda, M., Iwakaki, T., Matsumoto, M., Nakamura, M., et al. (2015) IRE1 $\alpha$ /XBP1-medi-

- ated branch of the unfolded protein response regulates osteoclastogenesis, *J. Clin. Invest.*, **125**, 3269-3279, doi: 10.1172/JCI76765.
85. Guo, J., Ren, R., Sun, K., Yao, X., Lin, J., et al. (2020) PERK controls bone homeostasis through the regulation of osteoclast differentiation and function, *Cell Death Dis.*, **11**, 1-16, doi: 10.1038/s41419-020-03046-z.
86. Raimondi, L., De Luca, A., Fontana, S., Amodio, N., Costa, V., et al. (2020) Multiple myeloma-derived extracellular vesicles induce osteoclastogenesis through the activation of the XBP1/IRE1 $\alpha$  axis, *Cancers*, **12**, 2167, doi: 10.3390/cancers12082167.
87. Cao, H., Yu, S., Yao, Z., Galson, D. L., Jiang, Y., et al. (2010) Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice, *J. Clin. Invest.*, **120**, 2755-2766, doi: 10.1172/JCI42106.
88. Wang, K., Niu, J., Kim, H., and Kolattukudy, P. E. (2011) Osteoclast precursor differentiation by MCP1P via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy, *J. Mol. Cell Biol.*, **3**, 360-368, doi: 10.1093/jmcb/mjr021.
89. Lee, E. G., Sung, M. S., Yoo, H. G., Chae, H. J., Kim, H. R., et al. (2014) Increased RANKL-mediated osteoclastogenesis by interleukin-1 $\beta$  and endoplasmic reticulum stress, *Joint Bone Spine*, **81**, 520-526, doi: 10.1016/j.jbspin.2014.04.012.
90. Zhang, L., Bao, D., Li, P., Lu, Z., Pang, L., et al. (2018) Particle-induced SIRT1 downregulation promotes osteoclastogenesis and osteolysis through ER stress regulation, *Biomed. Pharmacother.*, **104**, 300-306, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.030.
91. Lee, W. S., Jeong, J. H., Lee, E. G., Choi, Y., Kim, J. H., et al. (2017) Tacrolimus regulates endoplasmic reticulum stress-mediated osteoclastogenesis and inflammation: *in vitro* and collagen-induced arthritis mouse model, *Cell Biol. Int.*, **42**, 393-402, doi: 10.1002/cbin.10861.
92. He, L., Lee, J., Jang, J. H., Sakchaisri, K., Hwang, J., et al. (2013) Osteoporosis regulation by salubrinal through eIF2 $\alpha$  mediated differentiation of osteoclast and osteoblast, *Cell. Signal.*, **25**, 552-560, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.11.015.
93. Li, J., Li, X., Liu, D., Hamamura, K., Wan, Q., et al. (2019) eIF2 $\alpha$  signaling regulates autophagy of osteoblasts and the development of osteoclasts in OVX mice, *Cell Death Dis.*, **10**, 1-15, doi: 10.1038/s41419-019-2159-z.

## ROLE OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL CELLS

### Review

E. P. Turishcheva\*, M. S. Vildanova, G. E. Onishchenko, and E. A. Smirnova

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia; e-mail: kitten-caterina@yandex.ru*

The endoplasmic reticulum (ER) is a multifunctional membrane compartment, which is responsible for the synthesis and processing of secretory, lysosomal and transmembrane proteins. Incorrect processing of proteins during disturbed ER homeostasis leads to the development of the ER stress. To restore the normal ER function, cells utilize the specific adaptive mechanism — unfolded protein response (UPR). In addition to controlling of protein folding, UPR plays a key role in other physiological processes, such as differentiation of connective tissue, muscle, epithelial and neural cells. Moreover, only the physiological level of ER stress stimulates differentiation, while the increased level of ER stress suppresses differentiation and may cause the cell death. It is currently unknown whether UPR activation acts as an inducer of cell differentiation or UPR is triggered by increased synthesis of secretory proteins during differentiation. Cell differentiation is an important step in the development of multicellular organisms, so this process must be effectively controlled. Suppression or, conversely, excessive activation of differentiation leads to the development of pathological processes in the organism. For instance, disbalance in the level of differentiation of the connective tissue may lead to the development of obesity, osteoporosis, and fibrosis. The latter is currently a subject of thorough investigation, because appeared to be one of the consequences of COVID-19 infection. Therefore, further investigations of the crosstalk between UPR and cellular differentiation may lead to the identification of potential molecular targets that allow selective regulation of different stages of differentiation and influence the mechanisms leading to the development of pathological processes.

*Keywords:* endoplasmic reticulum, differentiation, endoplasmic reticulum stress, UPR, myofibroblasts, fibrosis, adipogenesis, myogenesis, osteoblastogenesis, osteoclastogenesis

**ДЕЛЕЦИОННЫЕ ВАРИАНТЫ  
АУТОТРАНСПОРТЕРА *Psychrobacter cryohalolentis*  
ПОВЫШАЮТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПОНИРОВАНИЯ <sup>10</sup>FN3  
НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *Escherichia coli***

© 2022 Л.Н. Шингарова<sup>1\*</sup>, Л.Е. Петровская<sup>1</sup>, Е.А. Крюкова<sup>1</sup>, С.Ш. Гапизов<sup>1,2</sup>,  
Е.Ф. Болдырева<sup>1</sup>, Д.А. Долгих<sup>1,2</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 Москва, Россия; электронная почта: lshingarova@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 11.07.2022

Принята к публикации 11.07.2022

Аутоотранспортер AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* относится к семейству белков внешней мембраны, содержащих *N*-концевой пассажирский и *C*-концевой транслокаторный домены и составляющих основу для конструирования систем дисплея на поверхности клеток бактерий. Ранее мы показали, что пассажирский домен AT877 может быть заменен холодоактивной эстеразой EstPc или 10-м доменом фибронектина III-го типа (<sup>10</sup>Fn3). С целью повышения эффективности поверхностного дисплея <sup>10</sup>Fn3 в клетках *Escherichia coli* получены 4 делеционных варианта гибридного аутоотранспортера Fn877. Установлено, что все варианты обнаруживаются в мембране бактериальных клеток и обеспечивают связывание специфических к <sup>10</sup>Fn3 антител на поверхности клетки. Наиболее высокий уровень связывания обеспечивают варианты Δ239 и Δ310, содержащие 4 и 7 бета-тяжей из 12, составляющих структуру транслокаторного домена. С помощью электрофореза в полунативных условиях продемонстрировано наличие тепловой модифицируемости полноразмерного Fn877 и его делеционных вариантов, что указывает на сохранение бета-структуры в их молекулах. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации систем бактериального дисплея <sup>10</sup>Fn3, а также других гетерологичных пассажирских доменов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** секреция, аутоотранспортер, делеционные варианты, 10-й домен фибронектина человека III-го типа, бактериальный дисплей.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090044, **EDN:** BALEXT

## ВВЕДЕНИЕ

Аутоотранспортеры (АТ) представляют собой семейство белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий, использующих в процессе экспорта систему секреции V-го типа [1]. Они играют важную роль в процессах вирулентности и выживания различных микроорганизмов, включая патогенные. Молекулы зрелых АТ состоят из *N*-концевого пассажирского и *C*-концевого транслокаторного доменов, соединенных альфа-спиральным сегментом (линкером). Общей чертой строения

транслокаторных доменов АТ является наличие структуры типа бета-бочонка, который включает в себя 12 амфипатических бета-тяжей [2, 3].

Транспорт АТ в периплазматическое пространство осуществляется с участием Sec-аппарата бактериальной клетки. АТ синтезируются в виде предшественников, содержащих *N*-концевую сигнальную последовательность, которая отщепляется в процессе транспорта. В процессе секреции компетентное состояние АТ поддерживается благодаря взаимодействию с шаперонами (SurA, Skp и др.), а также характерной для них низкой скорости сворачивания [4, 5]. Встраивание АТ во внешнюю мем-

Принятые сокращения: АТ – аутоотранспортер; <sup>10</sup>Fn3 – 10-й домен фибронектина человека III-го типа; IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; PBS – фосфатно-солевой буфер.

\* Адресат для корреспонденции.



брану происходит с участием белков Bam-комплекса, который включает в себя интегральный белок BamA и липопротеины BamB–E [6, 7].

Установлено, что природный пассажирский домен АТ в ряде случаев может быть заменен другим белком. Такой подход лежит в основе конструирования систем дисплея рекомбинантных белков на поверхности клеток бактерий [8–10], которые могут быть использованы в ряде биотехнологических и промышленных областей, включая разработку живых вакцин, конструирование и скрининг комбинаторных библиотек, получение биоадсорбентов для удаления из окружающей среды вредных химических веществ и тяжелых металлов, получение цельноклеточных биокатализаторов для диагностических, промышленных приложений и биоремедиации окружающей среды [11, 12].

Нами была сконструирована система клеточного дисплея на поверхности клеток *Escherichia coli* на основе аутотранспортера АТ877 грамотрицательной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5<sup>T</sup> [13]. Природный пассажирский домен АТ877, представляющий собой липазу семейства GDSL, был заменен холодоактивной эстеразой EstPc *P. cryohalolentis* [13, 14], а также доменом 10 фибронектина III-го типа человека (<sup>10</sup>Fn3) [15]. <sup>10</sup>Fn3 является популярным каркасным белком, на основе которого могут быть получены искусственные связывающие молекулы – аналоги антител, обладающие небольшим размером и высокой стабильностью [16–18]. Установлено, что рекомбинантные пассажирские домены экспонированы на поверхности клеток и демонстрируют характерные каталитические свойства (в случае EstPc) или связывание специфических антител (в случае <sup>10</sup>Fn3).

Следует отметить, что уровень экспрессии <sup>10</sup>Fn3 в качестве пассажирского домена АТ877 на поверхности клеток *E. coli* оказался сравнительно низким [15], предположительно, вследствие высокой скорости сворачивания белка в цитоплазме клеток [19]. Размещение холодоактивной эстеразы EstPc на N-конце

пассажирского домена способствовало повышению эффективности поверхностного дисплея <sup>10</sup>Fn3 [15], что позволило провести отбор библиотеки ФНО-связывающих вариантов данного каркасного белка [20]. Однако присутствие EstPc в составе пассажирского домена может оказаться нежелательным, например, в случае терапевтического использования полученных конструкций.

В данной работе нами получен и исследован ряд делеционных мутантов Fn877 и обнаружены варианты, демонстрирующие повышенную эффективность транспорта <sup>10</sup>Fn3 на поверхности клетки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реактивы фирм «Bio-Rad» США, «Merck» США, «Panreac» Испания; компоненты сред для культивирования бактерий («Difco», США); органические растворители производства «Химмед» Россия. Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

**Клонирование рекомбинантных ДНК** осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue («Stratagene», США). Использовали ферменты производства «Thermo Fisher Scientific», США. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Евроген», Россия. Для конструирования делеционных вариантов Fn877 проводили ПЦР с праймерами, приведенными в таблице.

Фрагменты клонировали в вектор pET20b по сайтам *NcoI* и *XhoI*, аналогично гену исходного белка, и подтверждали последовательность вставки секвенированием («Евроген»).

**Выделение мембранной фракции.** Культуру клеток штамма *E. coli* C41(DE3) («Avidis SA», Франция), трансформированную одной из плазмид, выращивали в LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °С до значения ОП при 560 нм 0,5–0,7, индуцировали экспрессию белка добавлением 0,2 мМ изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (IPTG), после чего продол-

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для конструирования делеционных вариантов Fn877

Название	5'→3' последовательность праймеров	Длина, н.п.
D239rev	TTCTCCTCGAGCTGCACGCCCAAGCTT	29
D261rev	TTCTCCTCGAGGCCACCAAGTGTGACCGCA	30
D285rev	ACATCTCGAGCATCGGATATCCTGCCTGC	29
D310rev	TTCTCCTCGAGTTCTTTTAGCGCGTCCAATC	31

жали культивирование в течение 1,5 ч при 25 °С в присутствии 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Клетки осаждали при 2700 g 10 мин при 5 °С, после чего осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ EDTA, 20% сахарозы, лизоцим (0,2 мг/мл), и разрушали обработкой ультразвуком с использованием Branson Digital Sonifier («Emerson», США). Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугировали 1 час при 100 000 g, и суспендировали осадок мембранной фракции в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0).

Для анализа при помощи **Вестерн-блота** разделенные гель-электрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). После инкубации в растворе 1%-го BSA в TBS (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl) в течение 1 ч при 37 °С мембрану выдерживали в растворе конъюгата моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой (1 мкг/мл, «Invitrogen», США) в 1%-ном BSA в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашивание мембраны проводили с использованием преципитирующего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB, «Clinical Science Products», США).

Для проведения **ELISA** на целых клетках культуру выращивали, как описано выше. Клетки осаждали при 2700 g 6 мин при 5 °С, дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) в присутствии 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и центрифугировали в тех же условиях. Доводили мутность суспензии до ОП = 1 при 560 нм и наносили по 100 мкл в лунки планшета для ELISA («Corning», США) в трех повторностях. Клетки высушивали 20 ч в термостате при 37 °С, блокировали 2%-ным BSA и промывали PBST (PBS + 0,1% (v/v) Tween-20).

Моноклональные антитела к <sup>10</sup>Fn3 («Hybridoma Laboratories», Россия) добавляли в соотношении 1/1000 в PBS + 1% BSA, выдерживали 1 ч при 37 °С и перемешивании. После удаления антител промывали лунки 3 раза по 5 мин PBST. Для визуализации иммунных комплексов использовали конъюгат анти-мышь-HRP («Sigma», США) в соотношении 1/10 000. После отмытки в лунки добавляли по 100 мкл TMB, выдерживали 4 мин, затем останавливали реакцию добавлением 10%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Интенсивность окрашивания измеряли при 450 нм с помощью ридера Model 680 («Bio-Rad»).

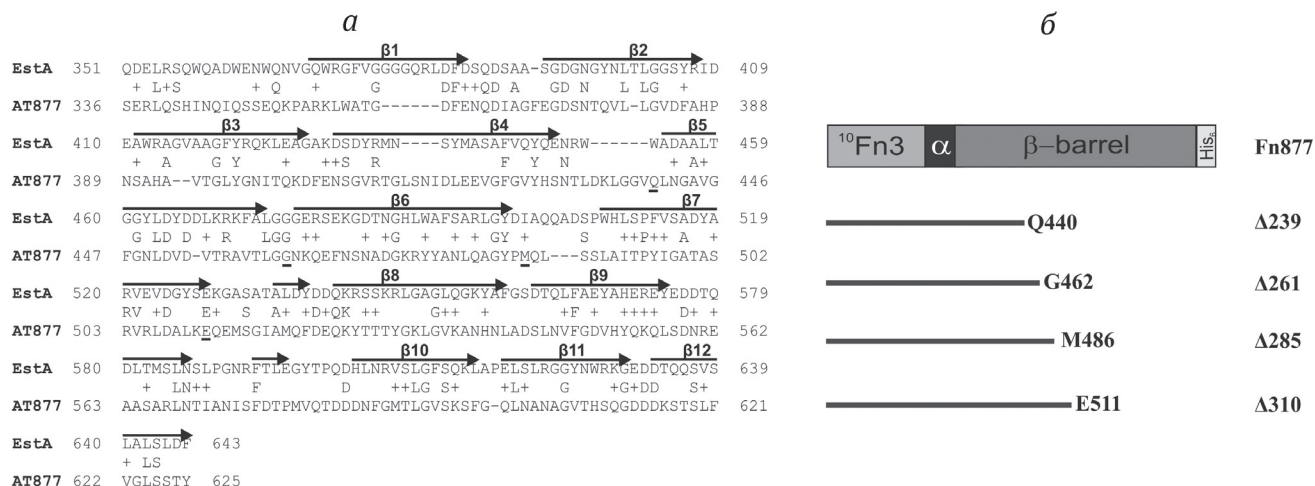
Для анализа экспонированности His-тага проводили ELISA в одну стадию, используя конъюгат моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой («Invitrogen»).

**Выделение рекомбинантных белков** проводили из культуры клеток *E. coli* C41(DE3), содержащей одну из полученных плазмид и выращенной в присутствии 0,2 мМ IPTG при 37 °С в LB с ампициллином в течение 3 ч. Биомассу суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF), и разрушали клетки обработкой ультразвуком на ледяной бане в течение 6 мин при 50% мощности. Осадок после центрифугирования растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl в течение 2 ч при комнатной температуре. После отделения нерастворенного материала центрифугированием супернатант наносили на колонку Ni-Sepharose FastFlow («GE Healthcare», США), уравновешенную тем же буфером с 6 М мочевиной, промывали этим буфером и элюировали буфером с 6 М мочевиной в присутствии 250 мМ имидазола. Фракции, содержащие очищенный белок по результатам электрофореза, объединяли. Для рефолдинга очищенных белков раствор белка порциями по 50 мкл добавляли в 0,5 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 1% LDAO (оксид лаурилдиметиламина) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем диализовали 2 раза против 100 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 0,05% LDAO.

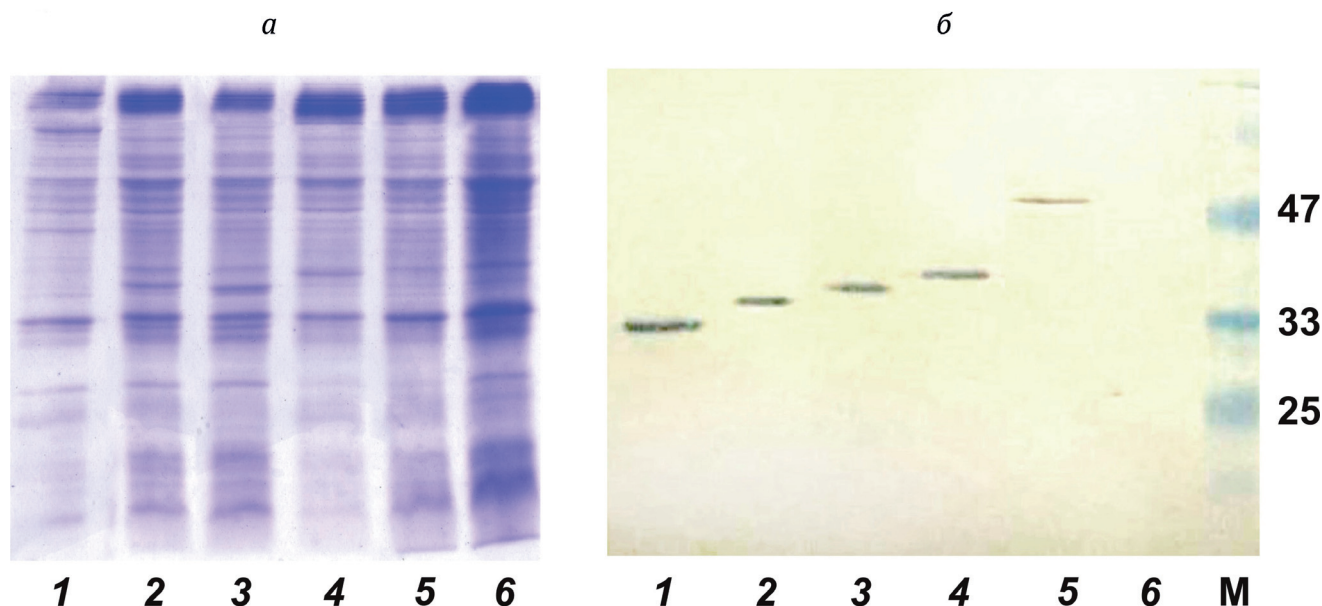
**Белковый электрофорез в полунативных условиях** проводили, как описано ранее [21], с модификациями. Аликвоты очищенных белков после рефолдинга прогревали при 37 °С или 95 °С в течение 10 мин и наносили на гель в буфере для образцов, не содержащем SDS. Электрофорез проводили в системе MiniProtean («Bio-Rad») при 4 °С с использованием электрода буфера, не содержащего SDS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Конструирование и экспрессия делеционных вариантов Fn877.** Поскольку пространственная структура AT877 в настоящее время неизвестна, для локализации элементов вторичной структуры данного белка мы провели выравнивание аминокислотной последовательности его транслокаторного домена с последовательностью AT эстеразы EstA *Pseudomonas aeruginosa* [22]. Мы запланировали получение четырех делеционных вариантов, содержащих, соответственно, 4–7 бета-тяжей из 12, предположительно, имеющих в полноразмерном белке AT877 (рис. 1). Соответственно, в каче-



**Рис. 1.** Структура делеционных вариантов Fn877. *а* – Выравнивание аминокислотных последовательностей транслокаторных доменов AT877 и EstA *P. aeruginosa* с помощью Protein Blast. Расположение бета-тяжей в транслокаторном домене EstA (PDB: 3KVN) обозначено стрелками. С-концевые остатки делеционных вариантов Fn877 ( $\Delta 239$ ,  $\Delta 261$ ,  $\Delta 285$  и  $\Delta 310$  соответственно) подчеркнуты. *б* – Схемы Fn877 и делеционных вариантов.  $^{10}\text{Fn3}$  – 10-й домен фибронектина человека III-го типа;  $\alpha$  – альфа-спиральный линкер;  $\beta$ -barrel – транслокаторный домен AT877



**Рис. 2.** Белковый электрофорез в 10%-ном ПААГ-SDS (*а*) и Вестерн-блот с анти-Нис конъюгатом (*б*) образцов мембранной фракции клеток С41(DE3), экспрессирующих делеционные варианты Fn877. Дорожки: 1 –  $\Delta 239$ ; 2 –  $\Delta 261$ ; 3 –  $\Delta 285$ ; 4 –  $\Delta 310$ ; 5 – Fn877; 6 – Fn877 без индукции (отрицательный контроль). М – маркеры молекулярного веса белков (кДа)

стве С-концевых были выбраны аминокислотные остатки, находящиеся на границе бета-тяжей – Q440, G462, M486 и E511.

Гены делеционных вариантов Fn877  $\Delta 239$ ,  $\Delta 261$ ,  $\Delta 285$  и  $\Delta 310$  (цифра обозначает число аминокислотных остатков в рекомбинантном АТ после отщепления сигнального пептида) были получены с помощью ПЦР и клонированы в вектор pFn877, содержащий кодирующие последовательности  $^{10}\text{Fn3}$ , альфа-спирального линкера и транслокаторного домена AT877 под контролем промотора T7lac [15]. Экспрессию полученных генов осуществляли в клетках

*E. coli* штамма С41(DE3), оптимизированного для синтеза мембранных белков [23]. Для определения локализации полученных гибридных АТ проведено исследование мембранных фракций клеток *E. coli* с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистидиновой последовательности. Установлено, что все укороченные варианты АТ обнаруживаются в мембранной фракции, при этом уровень их мембранной локализации превышает таковой в случае полноразмерного Fn877 (рис. 2). Необходимо отметить, что продолжительное культивирование приводило



к накоплению рекомбинантных АТ в нерастворимой фракции клеток в составе телец включения, как ранее было описано для Fn877 [15] и АТ877 [24]. Это было использовано в дальнейшем для получения белков в очищенном виде и рефолдинга (см. ниже).

**Анализ экспонирования  $^{10}\text{Fn3}$  на поверхности клеток *E. coli*.** Для доказательства экспонирования пассажирского домена на поверхности клеток *E. coli*, экспрессирующих различные варианты Fn877, был проведен их анализ методом ELISA с использованием моноклональных антител к  $^{10}\text{Fn3}$ . Продемонстрировано, что все варианты обеспечивают связывание антител на клеточной поверхности, при этом наиболее высокий уровень связывания и, соответственно, экспонирования, в 3,3 раза превышающий контрольный (для клеток, экспрессирующих Fn877), демонстрирует вариант  $\Delta 310$  (рис. 3, а). Делеционные варианты  $\Delta 239$  и  $\Delta 285$  обеспечивали в 2 раза более высокий уровень связывания по сравнению с Fn877, а вариант  $\Delta 261$  практически не отличался от контроля.

Для того чтобы убедиться в целостности клеток в процессе выращивания и иммуноферментного анализа, мы провели аналогичный эксперимент с использованием антител к гексагистиридиновой последовательности. Поскольку С-конец АТ877, предположительно, ориентирован в периплазматическое пространство, в случае сохранения интактной клеточной мембраны взаимодействие с антителами к His-тагу должно быть гораздо ниже, чем при ее разрушении. Действительно, уровень сигнала, обеспечиваемый клетками с экспрессией  $\Delta 239$  и  $\Delta 310$  после обработки лизоцимом, оказался примерно в 4 раза выше, чем у клеток, не подвергавшихся такой обработке (данные не приведены), что доказывает отсутствие существенного лизиса.

Мы также получили делеционные варианты  $23\Delta 239$  и  $23\Delta 310$  гибридных АТ, содержащих

холодоактивную эстеразу EstPc на N-конце пассажирского домена [15], и изучили эффективность экспонирования  $^{10}\text{Fn3}$  на поверхности клеток с помощью аналогичного подхода. Подобно  $23\text{Fn877}$ , содержащему полноразмерный транслокаторный домен, делеционные варианты обеспечивали существенно более высокий (в 4–6 раз выше) уровень сигнала по сравнению с Fn877. При этом, как выяснилось, делеции оказывают незначительное влияние на связывание антител к  $^{10}\text{Fn3}$  клетками, экспрессирующими такие варианты, по сравнению с вариантом  $23\text{Fn877}$  (рис. 3, б).

**Исследование фолдинга делеционных вариантов АТ877.** Известно, что белки внешней мембраны, обладающие нативной конформацией, демонстрируют способность к так называемой «тепловой модифицируемости» [20, 25]. При соблюдении определенных условий наличие SDS в составе геля для электрофореза не приводит к денатурации таких белков благодаря высокой стабильности бета-структуры, содержащей большое количество водородных связей. Однако инкубация при высокой температуре разрушает эту структуру, в результате чего их электрофоретическая подвижность меняется. Таким образом, определение тепловой модифицируемости с помощью белкового электрофореза представляет собой стандартный тест для оценки правильного фолдинга белков внешней мембраны [25]. При этом в каждом случае требуется индивидуальный подбор методики подготовки образцов (состава буфера для нанесения, времени и температуры прогрева и т.п.), позволяющей различать нативное и денатурированное состояние.

Для того чтобы проверить наличие нативной конформации у полученных делеционных вариантов, мы провели очистку в денатурирующих условиях и рефолдинг белков  $\Delta 239$ ,  $\Delta 310$  и Fn877 из телец включения (рис. 4, а), после

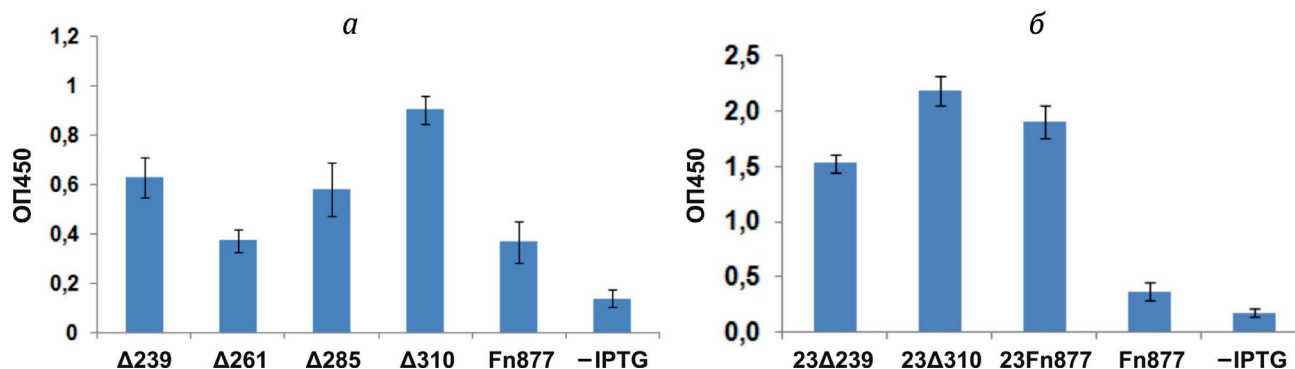
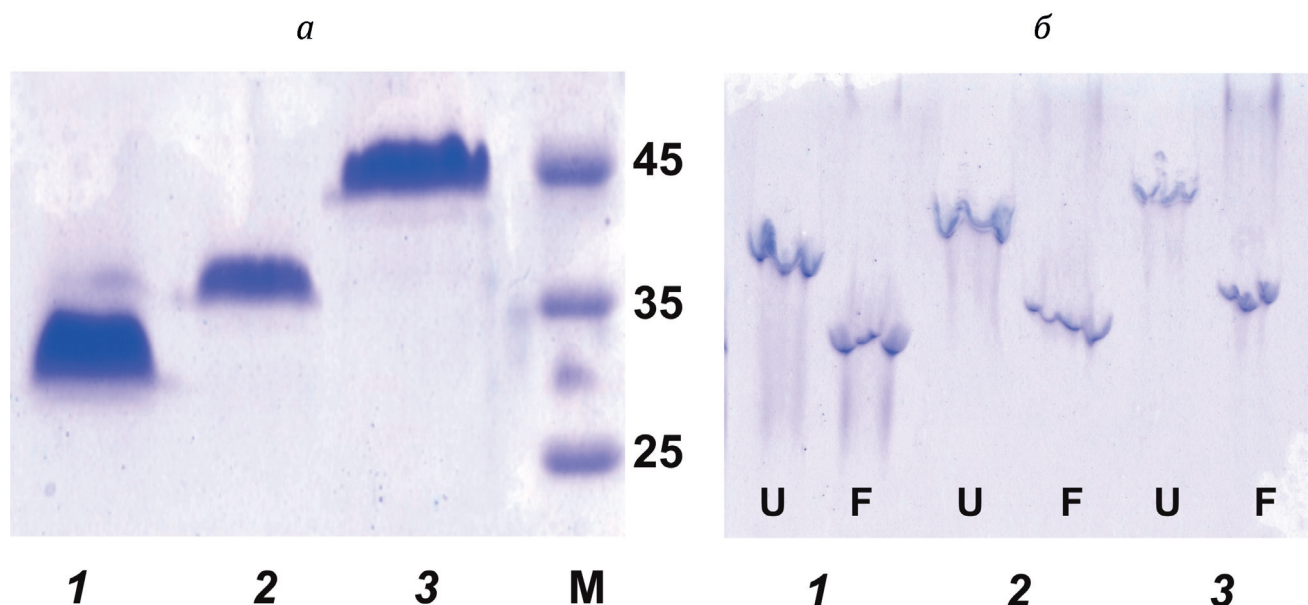


Рис. 3. Анализ методом ELISA с антителами к  $^{10}\text{Fn3}$  экспонирования пассажирского домена на поверхности клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих варианты Fn877 (а) и варианты  $23\text{Fn877}$  (б). -IPTG – клетки, выращенные в тех же условиях без добавления IPTG (отрицательный контроль)



**Рис. 4.** Анализ фолдинга делеционных вариантов АТ877. Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ в денатурирующих (а) и полунативных (б) условиях выделенных и рефолдированных белков  $\Delta 239$  (дорожка 1),  $\Delta 310$  (дорожка 2) и Fn877 (дорожка 3). Перед нанесением на гель образцы были прогреты при 37 °С (F) или 95 °С (U)

чего разработали протокол их анализа методом полунативного белкового электрофореза. Электрофоретическая подвижность образцов выделенных белков, прогретых при 95 °С, оказалась существенно ниже, чем у выдержанных при 37 °С (рис. 4, б), что указывает на присутствие нативной бета-структуры в молекулах исследованных вариантов АТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биогенез АТ включает ряд последовательных стадий – синтез белка-предшественника в цитоплазме клеток, транспорт в периплазматическое пространство с отщеплением сигнальной последовательности и встраивание во внешнюю мембрану [1–4]. Структура природных АТ оптимизирована таким образом, чтобы обеспечить координированное протекание различных этапов данного процесса с участием многочисленных клеточных факторов (аппарата трансляции, секреторного комплекса, шаперонов в цитоплазме и периплазме, Bam-комплекса и др.). Важную роль в нем играют свойства пассажирского и транслокаторного доменов.

Большинство пассажирских доменов АТ обладает  $\beta$ -спиральной пространственной структурой [2]. Согласно принятой в настоящее время модели секреции, пассажирский домен преодолевает внешнюю мембрану в развернутой конформации. Сворачивание его С-концевого фрагмента, обладающего повышенной стабильностью (так называемого «аутошаперо-

на»), на клеточной поверхности предотвращает обратный транспорт в периплазму, в результате чего процесс приобретает необратимый характер [26, 27]. Эксперименты по фолдингу *in vitro* ряда пассажирских доменов АТ показали, что стабильность их С-концевых фрагментов превышает стабильность N-концевых [27, 28].

Известно, что домен фибронектина обладает высокой скоростью сворачивания и стабильной структурой [20]. Мы предполагаем, что быстрый фолдинг гибридных АТ, содержащих  $^{10}\text{Fn3}$  в качестве пассажирского домена, является причиной низкого уровня его экспонирования на клеточной поверхности. Ранее нами был предложен оригинальный подход для оптимизации системы дисплея  $^{10}\text{Fn3}$ , который фактически представляет собой создание искусственного градиента стабильности с повышением ее в направлении С-конца этого домена [15]. Полученные в данной работе результаты открывают перспективы альтернативного подхода с использованием укороченных вариантов АТ877. Мы показали, что наличие в составе транслокаторного домена 4 бета-тяжей из 12 достаточно для дисплея  $^{10}\text{Fn3}$  в качестве пассажирского домена на поверхности клетки. При этом уровень экспонирования данного варианта в 2 раза превышает уровень Fn877. Увеличение числа бета-тяжей до 7 дополнительно повышает количество белка на поверхности клеток (более чем в 3 раза по сравнению с полноразмерным белком).

Необходимо отметить, что укорочение транслокаторных доменов АТ, содержащих

эстеразу EstPc в составе пассажирского домена, не сопровождалось увеличением экспонированности  $^{10}\text{Fn3}$  по сравнению с полноразмерным белком 23Fn877. Таким образом, два предложенных нами подхода повышения эффективности клеточного дисплея, вероятно, опосредуются различными механизмами и не дополняют друг друга.

Механизм секреции АТ на клеточную поверхность в настоящее время до конца не изучен, поэтому можно лишь предполагать, каким образом укорочение транслокаторного домена АТ877 способствует повышению эффективности клеточного дисплея  $^{10}\text{Fn3}$  в *E. coli*. Известно, что размер центральной поры транслокаторного домена составляет 1–2 нм, что не позволяет разместить в ней свернутые белки [29]. Новейшие данные свидетельствуют о том, что в процессе транспорта BamA ассоциирует с транслокаторным доменом АТ с образованием гибридного бета-бочонка [30]. Таким образом, транслокация пассажирского домена происходит через пору, образованную BamA, что в результате может обеспечивать транспорт пассажирских доменов, содержащих структурированные элементы [2]. В этом случае решающим фактором, определяющим эффективность поверхностного дисплея, является взаимодействие транслокаторного домена с BamA, которое может происходить с разной эффективностью в случае различных вариантов Fn877.

Узнавание субстратов BamA происходит благодаря С-концевому мотиву АТ, включающему ароматический остаток (бета-сигнал) [31]. Известно, что подавляющее большинство белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий в качестве С-концевого аминокислотного остатка содержит триптофан [32], в то время как аминокислотная последовательность АТ877 заканчивается остатком тирозина. В то же время установлено наличие в последовательности АТ альтернативных бета-сигналов, например, в составе 8-го бета-тяжа в случае EstA [33]. Конфигурация таких сигналов в составе транслокаторных доменов, полученных нами делеционных вариантов Fn877, может отличаться от полноразмерного, что, в свою очередь, должно оказывать влияние на их взаимодействие с BamA и эффективность дисплея пассажирского домена.

Нельзя исключить также существование механизма, включающего формирование олигомерных структур на основе укороченных вариантов транслокаторного домена АТ877. Типичные транслокаторные домены содержат 12 бета-тяжей, однако у представителей семейства тримерных АТ структура бета-бочонка

образуется за счет взаимодействия 4 бета-тяжей каждого из мономеров [34]. Мультимеризация бета-тяжей, по-видимому, представляет собой эволюционный механизм появления природных бета-структур [35] и может быть использована для их конструирования *in vitro*. Так, на основе белка внешней мембраны OmpX, содержащего 8 бета-тяжей, были получены белки, включающие до 16 бета-тяжей [36]. Показано, что OmpA может быть восстановлен из отдельно экспрессированных фрагментов, которые ассоциируются с образованием функционального белка в мембране [37] и *in vitro* [38]. Таким образом, точное установление механизма секреции вариантов Fn877 требует проведения дополнительных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу того, что укороченные варианты Fn877 обладают нативной бета-структурой и локализованы во внешней мембране *E. coli*, что обеспечивает экспонирование пассажирского домена на поверхности клеток. Белки семейства АТ являются одними из наиболее часто используемых для создания систем клеточного дисплея, однако его эффективность может варьировать в зависимости от природы пассажирского и транслокаторного доменов. Предложенный в данной работе подход к повышению эффективности транспорта гибридного АТ, включающего  $^{10}\text{Fn3}$  в качестве пассажирского домена, может быть использован для оптимизации систем бактериального дисплея данного каркасного белка, а также других гетерологичных пассажирских доменов.

**Вклад авторов.** Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой; Л.Н. Шингарова, Е.А. Крюкова, С.Ш. Гапизов, Е.Ф. Болдырева – проведение экспериментов; Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, Д.А. Долгих – обсуждение результатов исследования; Л.Е. Петровская, Л.Н. Шингарова – написание текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway, *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 89-112, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093233.
- Van Ulsen, P., ur Rahman, S., Jong, W. S., Daleke-Schermerhorn, M. H., and Luirink, J. (2014) Type V secretion: from biogenesis to biotechnology, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1843**, 1592-1611, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.006.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., and Tommassen, J. (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme, *Res. Microbiol.*, **164**, 562-582, doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.010.
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E., and Henderson, I. R. (2012) From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 213-225, doi: 10.1038/nrmicro2733.
- Selkrig, J., Leyton, D. L., Webb, C. T., and Lithgow, T. (2014) Assembly of  $\beta$ -barrel proteins into bacterial outer membranes, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1843**, 1542-1550, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.009.
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J. H., and Bernstein, H. D. (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter  $\beta$  domain, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, E383-E391, doi: 10.1073/pnas.1103827108.
- Kim, K. H., Aulakh, S., and Paetzel, M. (2012) The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery, *Prot. Sci.*, **21**, 751-768, doi: 10.1002/pro.2069.
- Lee, S. Y., Choi, J. H., and Xu, Z. (2003) Microbial cell-surface display, *Trends Biotechnol.*, **21**, 45-52, doi: 10.1016/s0167-7799(02)00006-9.
- Nicolay, T., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2015) Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **41**, 109-123, doi: 10.3109/1040841X.2013.804032.
- Van Ulsen, P., Zinner, K. M., Jong, W. S. P., and Luirink, J. (2018) On display: autotransporter secretion and application, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny165, doi: 10.1093/femsle/fny165.
- Jose, J., Maas, R. M., and Teese, M. G. (2012) Autodisplay of enzymes – molecular basis and perspectives, *J. Biotechnol.*, **161**, 92-103, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.001.
- Wu, C. H., Mulchandani, A., and Chen, W. (2008) Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production, *Trends Microbiol.*, **16**, 181-188, doi: 10.1016/j.tim.2008.01.003.
- Petrovskaya, L., Novototskaya-Vlasova, K., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., et al. (2015) Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, *Extremophiles*, **19**, 161-170, doi: 10.1007/s00792-014-0695-0.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. (2012) Cloning, purification, and characterization of a cold adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **82**, 367-375, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01385.x.
- Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Shingarova, L., Boldyreva, E., Gapizov, S. S., et al. (2018) Fusion with the cold-active esterase facilitates autotransporter-based surface display of the 10th human fibronectin domain in *Escherichia coli*, *Extremophiles*, **22**, 141-150, doi: 10.1007/s00792-017-0990-7.
- Gebauer, M., and Skerra, A. (2020) Engineered protein scaffolds as next-generation therapeutics, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 391-415, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118.
- Chandler, P. G., and Buckle, A. M. (2020) Development and differentiation in monobodies based on the fibronectin type 3 domain, *Cells*, **9**, 610, doi: 10.3390/cells9030610.
- Akkapeddi, P., Teng, K. W., and Koide, S. (2021) Monobodies as tool biologics for accelerating target validation and druggable site discovery, *RSC Med. Chem.*, **12**, 1839-1853, doi: 10.1039/d1md00188d.
- Plaxco, K. W., Spitzfaden, C., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1997) A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules, *J. Mol. Biol.*, **270**, 763-770, doi: 10.1006/jmbi.1997.1148.
- Shingarova, L., Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Gapizov, S. S., Kryukova, E., et al. (2018) Construction of artificial TNF-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain using bacterial display, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 708-716, doi: 10.1134/S0006297918060081.
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., and Buchanan, S. K. (2015) Heat modifiability of outer membrane proteins from Gram-negative bacteria, *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, **1329**, 51-56, doi: 10.1007/978-1-4939-2871-2\_4.
- Van den Berg, B. (2010) Crystal structure of a full-length autotransporter, *J. Mol. Biol.*, **396**, 627-633, doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.061.
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J. Mol. Biol.*, **260**, 289-298, doi: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- Petrovskaya, L. E., Ziganshin, R. H., Kryukova, E. A., Zlobinov, A. V., Gapizov, S. S., et al. (2021) Increased synthesis of a magnesium transporter MgtA during recombinant autotransporter expression in *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **193**, 3672-3703, doi: 10.1007/s12010-021-03634-5.
- Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M., and Fleming, K. G. (2008)  $\beta$ -Barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane *in vivo* demonstrate varied folding behavior *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 26748-26758, doi: 10.1074/jbc.M802754200.
- Peterson, J. H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2010) Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal

- segment, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107**, 17739-17744, doi: 10.1073/pnas.1009491107.
27. Renn, J. P., Junker, M., Besingi, R. N., Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) ATP-independent control of autotransporter virulence protein transport via the folding properties of the secreted protein, *Chem. Biol.*, **19**, 287-296, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.11.009.
  28. Junker, M., Besingi, R. N., and Clark, P. L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion, *Mol. Microbiol.*, **71**, 1323-1332, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06607.x.
  29. Oomen, C. J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., et al. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter, *EMBO J.*, **23**, 1257-1266, doi: 10.1038/sj.emboj.7600148.
  30. Doyle, M. T., and Bernstein, H. D. (2021) BamA forms a translocation channel for polypeptide export across the bacterial outer membrane, *Mol. Cell*, **81**, 2000-2012, doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.023.
  31. Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Gelder, P. V., et al. (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif, *PLoS Biol.*, **4**, e377, doi: 10.1371/journal.pbio.0040377.
  32. Struyvé, M., Moons, M., and Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein, *J. Mol. Biol.*, **218**, 141-148, doi: 10.1016/0022-2836(91)90880-f.
  33. Celik, N., Webb, C. T., Leyton, D. L., Holt, K. E., Heinz, E., et al. (2012) A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters, *PLoS One*, **7**, e43245, doi: 10.1371/journal.pone.0043245.
  34. Meng, G., Surana, N. K., St. Geme III, J. W., and Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter, *EMBO J.*, **25**, 2297-2304, doi: 10.1038/sj.emboj.7601132.
  35. Dhar, R., and Slusky, J. S. (2021) Outer membrane protein evolution, *Curr. Opin. Str. Biol.*, **68**, 122-128, doi: 10.1016/j.sbi.2021.01.002.
  36. Arnold, T., Poynor, M., Nussberger, S., Lupas, A. N., and Linke, D. (2007) Gene duplication of the eight-stranded  $\beta$ -barrel OmpX produces a functional pore: a scenario for the evolution of transmembrane  $\beta$ -barrels, *J. Mol. Biol.*, **366**, 1174-1184, doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.029.
  37. Koebnik, R. (1996) *In vivo* membrane assembly of split variants of the *E. coli* outer membrane protein OmpA, *EMBO J.*, **15**, 3529-3537.
  38. Debnath, D., Nielsen, K. L., and Otzen, D. (2010) *In vitro* association of fragments of a  $\beta$ -sheet membrane protein, *Biophys. Chem.*, **148**, 112-120, doi: 10.1016/j.bpc.2010.03.004.

## DELETION VARIANTS OF AUTOTRANSPORTER FROM *Psychrobacter cryohalolentis* INCREASE THE EFFICIENCY OF <sup>10</sup>FN3 EXPOSURE ON THE SURFACE OF *Escherichia coli* CELLS

L. N. Shingarova<sup>1\*</sup>, L. E. Petrovskaya<sup>1</sup>, E. A. Kryukova<sup>1</sup>, S. S. Gapizov<sup>1,2</sup>,  
E. F. Boldyreva<sup>1</sup>, D. A. Dolgikh<sup>1,2</sup>, and M. P. Kirpichnikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
117997 Moscow, Russia; e-mail: lshingarova@gmail.com

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

The autotransporter AT877 from *Psychrobacter cryohalolentis* belongs to the family of outer membrane proteins containing the N-terminal passenger and C-terminal translocator domains and forming the basis for the design of display systems on the surface of bacterial cells. Earlier we showed that the passenger domain of AT877 can be replaced by the cold-active esterase EstPc or the tenth domain of fibronectin type III (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3). In order to increase the efficiency of the <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 surface display in *Escherichia coli* cells, four deletion variants of the F<sub>n</sub>877 hybrid autotransporter were obtained. It was found that all variants are detected in the membrane of bacterial cells and provide binding of specific antibodies to <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 on the cell surface. The highest level of binding is provided by variants  $\Delta$ 239 and  $\Delta$ 310, containing four and seven beta-strands out of twelve that comprise the structure of the translocator domain. Using electrophoresis under semi-native conditions, the presence of thermal modifiability in full-size F<sub>n</sub>877 and its deletion variants was demonstrated which indicates the preservation of the beta structure in their molecules. The results obtained can be used to optimize the bacterial display systems of <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, as well as other heterologous passenger domains.

**Keywords:** secretion, autotransporter, deletion variants, 10th human fibronectin type III domain, bacterial display

## ХИМИЧЕСКАЯ ПРОТЕОМИКА НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ЗАДАЧАХ ПОИСКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ МИШЕНЕЙ

### Мини-обзор

© 2022 И.И. Федоров<sup>1,2</sup>, В.И. Линева<sup>2</sup>, И.А. Тарасова<sup>1</sup>, М.В. Горшков<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики РАН им. Н.Н. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, 119334 Москва, Россия; электронная почта: mike.gorshkov@gmail.com

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 27.05.2022

После доработки 04.07.2022

Принята к публикации 06.07.2022

Быстроразвивающаяся в последние годы химическая протеомика представляет собой основной метод для идентификации взаимодействий малых молекул и белков в масштабах всего протеома и картирования сигнальных и/или метаболических путей этих взаимодействий. Метод позволяет не только идентифицировать белки-мишени для лекарств, охарактеризовать их токсичность и выявить возможные нецелевые белки, участвующие в побочных взаимодействиях с лекарством, но и выявить фундаментальные механизмы, регулирующие жизнедеятельность клеток в условиях лекарственного воздействия или особенностей физиологического состояния самого организма. Решение этих проблем играет ключевую роль в биологии и клинической практике, расширяя существующие возможности для решения фундаментальных и практических проблем медицины, включая диагностику различных форм тяжелых заболеваний или предсказание эффективности терапевтического воздействия. При этом развитие масс-спектрометрии высокого разрешения в последние годы позволило решать задачи поиска мишеней лекарственного воздействия на уровне всех белков клеточных протеомов. В данном обзоре рассматриваются основные задачи, стоящие перед химической протеомикой на основе масс-спектрометрии, описываются методы и подходы к их решению, а также приведены примеры реализации этих методов в практике биомедицинских исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** химическая протеомика, масс-спектрометрия, лекарственные мишени.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090056, **EDN:** BAVDEB

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на бурное развитие знаний в области биохимии и биомедицины, поиск, разработка и тестирование новых лекарственных препаратов до сих пор является наиболее сложным этапом разработки более эффективных

терапевтических подходов к лечению большинства социально-значимых заболеваний. Персонализированный отклик организма на терапию, а также развитие как индивидуальной, так и популяционной устойчивости патологий к лекарственному воздействию приводят к необходимости разработки новых препаратов и классов

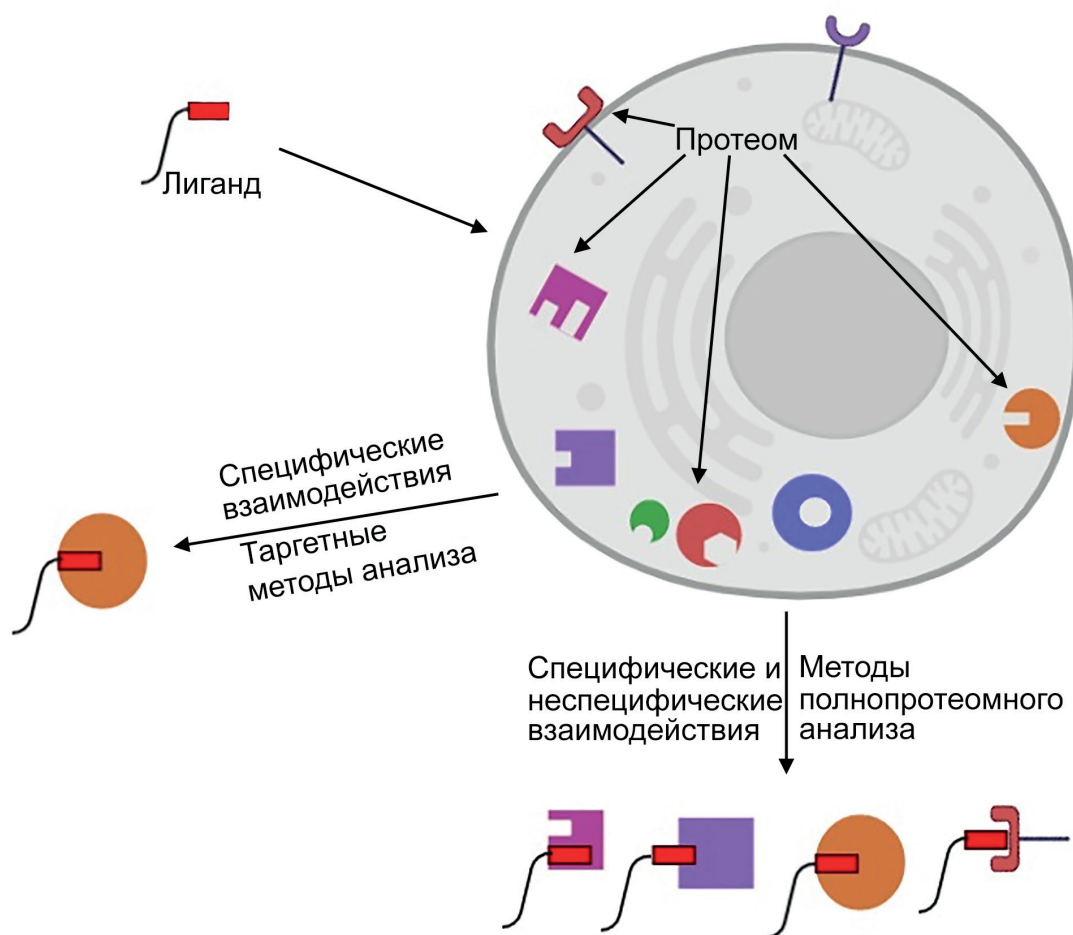
Принятые сокращения: ВЭЖХ-МС/МС – метод анализа сложных смесей органических и биоорганических соединений, включая протеолитические пептиды, основанный на комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии; МС – масс-спектрометрия; ТМТ – изобарные метки для мультиплексного количественного протеомного анализа на основе тандемной масс-спектрометрии; TPP – температурное профилирование протеомов; ABPP – метод профилирования белков по ферментативной активности; AS-MS – метод аффинного выделения белков в сочетании с масс-спектрометрической идентификацией; CCMS – метод масс-спектрометрической идентификации белков с использованием фотоиндуцированной сшивки; HDX-MS – масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена; LiP-MS – масс-спектрометрия структурно-зависимого протеолиза белков; PISA – метод интегрального измерения растворимости белков; PREPL – пролилэндопептидазоподобный фермент, кодируемый у человека геном *PREPL*.

\* Адресат для корреспонденции.



соединений для лечения одних и тех же заболеваний [1]. Тем не менее ни широкий выбор уже имеющихся лекарств, ни разнообразие терапевтических подходов на их основе зачастую не дают желаемый физиологический эффект. Подтверждением этому является, например, непрекращающееся противостояние антибиотиков и бактерий, развивающих устойчивость к ним [2]. Еще более характерным примером является быстроразвивающаяся резистентность клеток злокачественных опухолей практически ко всему спектру зарегистрированных и используемых в настоящее время противоопухолевых химиотерапевтических препаратов [3, 4]. Если говорить о лечении злокачественных опухолей, то одними из наиболее перспективных в последние годы рассматриваются подходы на основе таргетной терапии [5]. Упрощенно, эти подходы можно охарактеризовать как триаду «один организм—одна мишень—одно лекарство», в которой и мишень, и лекарство

определяются индивидуальными, или «персонализированными», особенностями развития патологии в конкретном организме. Однако и в рамках таких персонализированных подходов проблема выработки устойчивости патологических клеток к воздействию остается нерешенной. Кроме того, сама концепция «одно лекарство—одна мишень» является в общем случае ошибочной [6]. Лекарство неизбежно начинает взаимодействовать с другими молекулярными мишенями, причем не только в патологических, но и в здоровых клетках организма, вызывая довольно слабопредсказуемые (и, снова, «персонализированные») последствия, включая побочные эффекты. В свою очередь, побочные эффекты и их разнообразие могут быть обусловлены в том числе взаимодействием препарата не только с «узаконенными» мишенями, но и с иными молекулярными участниками процессов (рис. 1). Таким образом, создание лекарств нового поколения требует не только



**Рис. 1.** Задачей химической протеомики является поиск мишеней взаимодействия, как правило, небольших химических соединений с белками. В то время как традиционные методы химической протеомики позволяли выявлять и подтверждать специфические взаимодействия лигандов с конкретными белками, создание лекарств нового поколения требует не только изучения фармакокинетических свойств используемых химических препаратов, но и идентификации полного спектра их мишеней на уровне всего протеома клеток, включая те из них, которые участвуют в неспецифических взаимодействиях, потенциально ответственных за развитие побочных эффектов

тщательного изучения фармакокинетических свойств используемых химических препаратов, но и идентификацию полного спектра их мишеней для минимизации побочных эффектов и усиления эффективности и специфичности воздействия этих препаратов на патологические (и здоровые, в общем случае) клетки [7]. В настоящее время сложилось не только понимание необходимости таких исследований, но и были созданы методы, позволяющие решать эти задачи как на геномном уровне, так и на уровне всего протеома.

Методы химической протеомики являются эффективными инструментами для поиска и идентификации путей и мишеней взаимодействия химических соединений с белками клеток [7, 8]. В то время как аффинная хроматография по-прежнему является основным из таких методов исследования биологических взаимодействий и выделения белков, участвующих в специфических взаимодействиях с лигандами различной природы [9], развитие в последние годы протеомных технологий на основе масс-спектрометрии (МС) высокого разрешения позволило вывести задачу поиска мишеней таких взаимодействий на уровень всего протеома клеток [10]. При этом протеомный эксперимент направлен либо на идентификацию всех белков клетки, которые взаимодействуют с исследуемым химическим соединением, либо целью анализа является определение активности определенной группы белков протеома на основе их взаимодействия с большим набором химических соединений, например, в такой быстрорастущей теме исследований, как лекарственное «репрограммирование» [11].

В целом, персонализированные подходы к терапии являются в настоящее время доминирующими в лечении онкологических заболеваний, когда один и тот же тип ракового заболевания может возникать у пациентов с различными генетическими дефектами, при этом проявляя различные изменения профиля экспрессии белков, в том числе и в ответ на внешнее или терапевтическое воздействие [12]. Таким образом, методы таргетной медицины должны подразумевать персонализированный подход к подбору лекарственных препаратов и их молекулярных мишеней на клеточном уровне. Для реализации этого подхода требуются молекулярные индикаторы или маркеры, благодаря которым можно оценить эффективность терапии [13]. Значительные изменения концентрации отдельных белков протеома в результате воздействия химиопрепаратов могут служить источником информации об активированных каскадах белков-

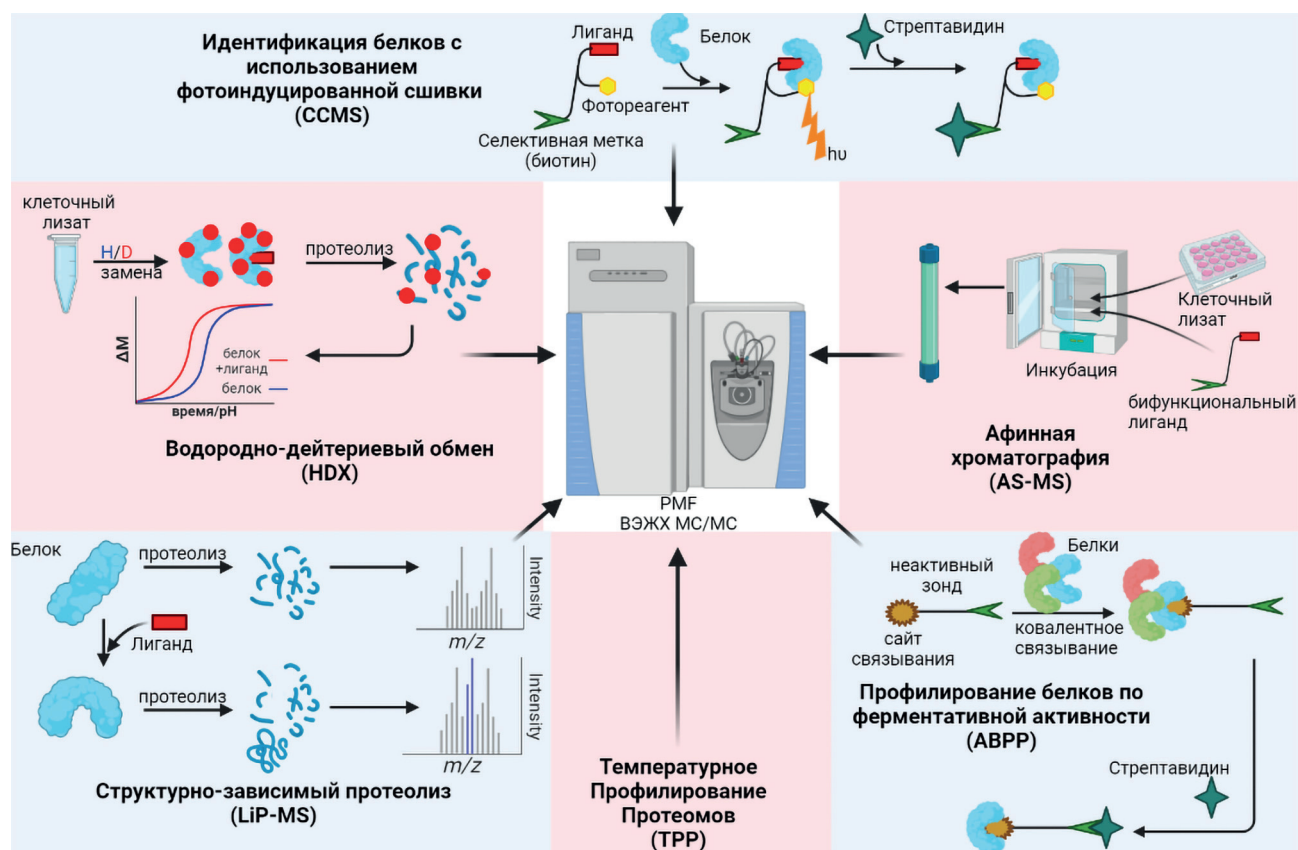
белковых взаимодействий и являться такими маркерами [14].

При этом количественная МС, основанная на масс-анализаторах высокого разрешения, позволяет в настоящее время выявлять такие изменения не только для отдельных, но и практически для всех белков протеомов [15].

Таким образом, методы химической протеомики являются эффективным инструментом при изучении молекулярных механизмов развития заболеваний, идентификации биомаркеров, а также определении мишеней для таргетной терапии. Развитие высокопроизводительной количественной МС биомолекул позволило вывести решение этих задач на уровень всех белков протеомов. В обзоре рассматриваются развиваемые в последние годы новые подходы, основанные на МС высокого разрешения, к исследованию результатов взаимодействия химических соединений, в первую очередь терапевтических лекарственных препаратов, с белками клеточных протеомов.

#### **МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ**

Идентификация белковых мишеней биоактивных химических соединений уже давно является одним из наиболее популярных направлений исследований в области химической биологии и поиска новых лекарств на основе фенотипического анализа клеток. Классическим примером такого поиска является выявление мишеней и механизмов возможного терапевтического действия веществ, используемых в традиционной медицине [16]. Если говорить о поиске белков, взаимодействующих с тем или иным химическим соединением на уровне всего клеточного протеома, то как наиболее широко используемые, так и находящиеся на начальной стадии своего развития современные методы химической протеомики основаны на использовании МС (рис. 2). В настоящее время МС высокого разрешения является основной технологией, используемой для структурной идентификации белков и панорамного количественного анализа протеомов. В современном исполнении метод позволяет идентифицировать несколько тысяч белковых групп в образцах протеомов клеточных линий и несколько сотен белковых групп в протеомах, характеризующихся высоким динамическим диапазоном концентрации белков, таких как плазма крови. После биоинформатического анализа, включающего идентификацию



**Рис. 2.** Развитие технологий полнопротеомного анализа на основе МС высокого разрешения позволяет решать задачу поиска всех мишеней лекарственного воздействия. При этом методы поиска таких белков, основанные на МС-идентификации взаимодействующих с лекарством белков, можно разделить на две группы: структурно-зависимые, в которых МС используется для измерения структурных изменений белков, участвующих во взаимодействиях, и методы, основанные на дериватизации анализируемого химического соединения с целью аффинного выделения всех провзаимодействовавших белков с последующей их идентификацией. В случае одиночных мишеней для их идентификации используется измерение точных масс их протеолитических пептидов. Для идентификации большого количества мишеней или поиска всех возможных мишеней на уровне всего протеома клетки используется «скорострельная» протеомика на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС)

белков, присутствовавших в образце, из полученных экспериментальных данных извлекают количественную информацию об относительном содержании белков, позволяющую определить биологические процессы и механизмы, запускаемые в клетках в ответ на внешнее или терапевтическое воздействие [17]. Использование количественного панорамного полнопротеомного анализа на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), позволяющего измерять изменения концентрации белков на уровне всего протеома клеток, дает возможность выявлять не только известные и ожидаемые мишени для того или иного лекарства, но и дополнительные, неизвестные ранее белки, с которыми оно взаимодействует [18]. Исследования в этом направлении особенно быстро развивались в последние годы в онкопротеомике в связи с развитием МС-технологий количественного анализа белков. Основной целью этих работ является составление

протеомных карт взаимодействия как новых, так и уже известных онкопрепаратов с белками протеомов клеточных линий рака различного типа [19, 20]. Общими проблемами таких исследований является не только необходимость анализировать большое количество систем «лекарство—протеом» для получения биологически значимой информации, но и выявлять возможные мишени того или иного препарата практически для каждого белка протеома, включая белки с посттрансляционными модификациями [21].

**Аффинная хроматография в комбинации с масс-спектрометрией (AS-MS).** Традиционным методом химической протеомики является аффинная хроматография [9], в основе которой лежит выделение мишеней лекарственного воздействия из клеточных экстрактов с помощью специальных химических соединений — химических зондов, созданных на основе исследуемого биоактивного препарата, специфически взаимодействующего с определен-



ными белками протеома. Химические зонды ковалентно иммобилизованы на стационарной фазе, специфически связываясь с белками протеома, растворенными в подвижной фазе. После промывки аффинной колонки и удаления нецелевых белков мишени, с которыми взаимодействует лиганд, белки-мишени снимаются с фазы элюирующим буфером [22, 23]. Если целевой белок известен или существуют предположения о нем на основе информационных данных [24], иммуноблоттинг с использованием стандартных методов [25] представляет собой простой, чувствительный и проверенный метод идентификации выделенного белка. В случае, например, биотиновой метки, используется аффинное выделение на стационарной фазе, иммобилизованной стрептавидином за счет уникальной по специфичности и силе связывания последнего с биотином способности. Однако в большинстве случаев целевые белки будут неизвестны, по крайней мере изначально, и выделенные белки-мишени идентифицируются масс-спектрометрически. Кроме того, таких белков может оказаться довольно много. В этих случаях методы, основанные на МС, в первую очередь метод пептидных отпечатков масс (Peptide Mass Fingerprinting, PMF [26]) или «скорострельная» протеомика [27], используются для идентификации всех выделенных белков-мишеней. На тех же принципах осуществляется и поиск мишеней химических соединений, например ионов металлов, красителей, кислот в металл-аффинной хроматографии белков (Immobilized-Metal Affinity Chromatography, IMAC [28]), в основе которой лежит обратимое взаимодействие аминокислотных остатков последовательностей, выступающих в качестве доноров электронов, с ионами металлов, хелатированными лигандами, иммобилизованными на поверхности стационарной фазы. Метод AS-MS играет важную роль в фосфопроотеомике, где используется для выделения фракций фосфорилированных пептидов в протеолитических смесях для последующего МС-анализа [29]. Сочетание аффинного обогащения с использованием меченых биоактивных малых молекул и количественной протеомики на основе МС высокого разрешения дает чувствительный и специфический инструмент для всестороннего профилирования взаимодействий лекарств в клеточных протеомах [8, 30].

**Масс-спектрометрическое профилирование протеомов по ферментативной активности.** В качестве примера использования химической протеомики, основанной на МС, для исследования определенного класса белков можно

привести выявление специфичности ингибиторов протеолитических ферментов методом количественного профилирования белков по ферментативной активности (Activity-Based Protein Profiling, ABPP [31]). Метод ABPP основан на использовании специально разработанных и синтезированных химических соединений (зондов), образующих ковалентные связи с активными сайтами протеаз. Эти соединения, в свою очередь, представляют собой аналоги лекарств, механизм действия которых исследуется. При этом ковалентное связывание зонда с протеазой свидетельствует о связывании и лекарства. Аффинные метки, такие как биотин, которые включают в химическую структуру зондов, позволяют выделить из протеома все ковалентносвязанные протеазы с последующим количественным МС-анализом (рис. 2). Так, например, метод ABPP позволил выявить на уровне всего протеома специфичность ингибиторов металлопротеаз, участвующих в регулировании множества важных физиологических и патологических процессов в клетках. Было показано, что металлопротеазы могут иметь перекрывающуюся чувствительность к ингибиторам. В связи с этим возникает задача оценки ингибиторов по этому классу ферментов в целом для последующей разработки препаратов с требуемой избирательностью [32]. Аналогичным образом можно установить взаимосвязь между избытком или недостатком конкретного белка в организме и возникновением симптомов заболевания. Например, недостаток фермента PREPL, кодируемого геном *PREPL*, в клетках приводит к возникновению симптомов синдрома гипотонии-цистинурии, проявляющихся в появлении нервно-мышечных и легких когнитивных нарушений [33]. В связи с этим возникает задача идентификации физиологических субстратов и путей, контролируемых PREPL, а также ингибиторов активности этого фермента, успешно решаемая с помощью метода ABPP. Еще одним примером использования этого метода химической протеомики в масштабе всего клеточного протеома при выявлении молекулярных механизмов развития заболеваний может служить исследование роли цистеиновых протеаз в выживаемости малярийных паразитов на стадии мерозойта и выявление ингибиторов активности тех из них, которые играли ключевую роль в развитии заболевания, убивающего до 2 млн человек в год [34]. Аналогичный подход на основе ABPP был использован в случае изучения вирусных заболеваний, в частности вируса гепатита С (HCV), в котором основными объектами исследования были белки

протеома хозяина, изменение ферментативной активности которых измерялось на стадии патологического процесса репликации вируса. Белки со статистически значимыми изменениями активности могут отвечать за взаимодействие вируса HCV с клетками хозяина и, соответственно, диагностическими и терапевтическими мишенями [35].

Одной из наиболее популярных областей исследований, в которых в последние годы используются методы химической протеомики в сочетании с МС, является выяснение механизмов и роли фосфорилирования белков при раковых заболеваниях. Фосфорилирование представляет собой модификацию белка после завершения процесса трансляции путем присоединения к белку фосфатной группы [36]. Процесс катализируется особой группой ферментов, которые называются киназами. Киназы фосфорилируют около 30% всех белков человека, в том числе и те, которые отвечают за сложные молекулярные процессы (рост, дифференцировка, пролиферация и апоптоз) [37]. Активность этих ферментов находится под строгим контролем, однако в случае мутации киназ или других генетических изменениях регуляция нарушается, что приводит к возникновению злокачественных опухолей. Таким образом, киназы являются потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии [38].

Здесь следует отметить, что при использовании ингибиторов активности большого класса белков, тех же киназ, таргетная терапия сталкивается с существенной проблемой. Ингибиторы распознают консервативные участки, которые одинаковы для многих белков данного класса. В случае киназ в роли такого участка выступает так называемый АТР-связывающий «карман» [39]. Таким образом, ингибиторы, нацеленные на определенный консервативный участок, могут перекрестно взаимодействовать с другими членами класса и другими белками, связанными с этим участком. Возникает задача идентификации возможных мишеней действия конкретного ингибитора среди всех белков клеток, которая в настоящее время может быть решена методами химической протеомики, основанными на полнопротеомном количественном МС-анализе [40, 18].

**Масс-спектрометрическая идентификация белков с использованием фотоиндуцированной сшивки.** Ингибиторы со специфической активностью по отношению к определенным белкам могут быть модифицированы путем присоединения реакционной группы, которая может образовывать ковалентные связи с аминокислотными остатками последовательностей белков

под действием, например, ультрафиолетового излучения, а также метки, используемой для последующего аффинного выделения таких белков, например биотина. На том же принципе основан поиск всех возможных мишеней взаимодействия исследуемых химических соединений с протеомами в методе МС-идентификации белков с использованием фотоиндуцированной сшивки (Capture Compound Mass Spectrometry, CCMS [41]). Исследуемое химическое соединение модифицируется добавлением двух функциональных групп, одна из которых ковалентно связывается с аминокислотными остатками белка под действием УФ-излучения (фотоиндуцированная сшивка), а другая используется как метка, за которую связаный с этим соединением белок выделяется из протеомной смеси (рис. 2). Основной целью метода CCMS является выявление не только белков-мишеней, специфически связывающихся с исследуемым лекарством, но и неспецифически связывающихся белков, которые тем не менее играют роль в активировании определенных каскадов белок-белковых взаимодействий, ответственных за ответ клеток на лекарственное воздействие и связанных с развитием, например, побочных процессов. При отсутствии ковалентной сшивки белки в большинстве случаев будут потеряны. Выделенные из протеома белки-мишени идентифицируются с использованием «скорострельной» протеомики на основе ВЭЖХ-МС/МС-анализа [27]. Метод CCMS особенно хорошо подходит для поиска как можно большего набора потенциальных взаимодействий малых молекул с белками. Особенностью метода является возможность его реализации непосредственно в растворе при физиологических условиях, в которых белки находятся в нативной форме. В отличие от аффинной хроматографии, связанной с использованием стационарной фазы с заданными свойствами, такими как размер пор, метод не имеет каких-либо ограничений на размер лигандов. Также преимуществом метода в сравнении с АВРР является то, что в случае АВРР выбор анализируемых соединений ограничен исключительно теми, которые ковалентно связываются с активными центрами ферментов, как в случае, например, сериновых протеаз. Метод CCMS может использоваться для исследований специфичности химических соединений, образующих слабые нековалентные связи с белками-мишенями. В качестве известного примера реализации метода CCMS в химической протеомике можно упомянуть работу Fischer et al. [42] по идентификации всех возможных белков, взаимодействующих

с лекарствами толкапон и энтакапон, используемыми для лечения болезни Паркинсона. Оба лекарства являются ингибиторами фермента COMT (catechol-O-methyltransferase), нередко проявляя при этом тяжелые гепатотоксические эффекты в клинической практике [43–45]. В частности, в упомянутой выше работе Fischer et al. [42], методом ССМС было идентифицировано 124 белка клеточной линии НерG2, которые взаимодействовали с толкапоном, часть из которых относилась к белкам, ответственным за возможные побочные эффекты терапии.

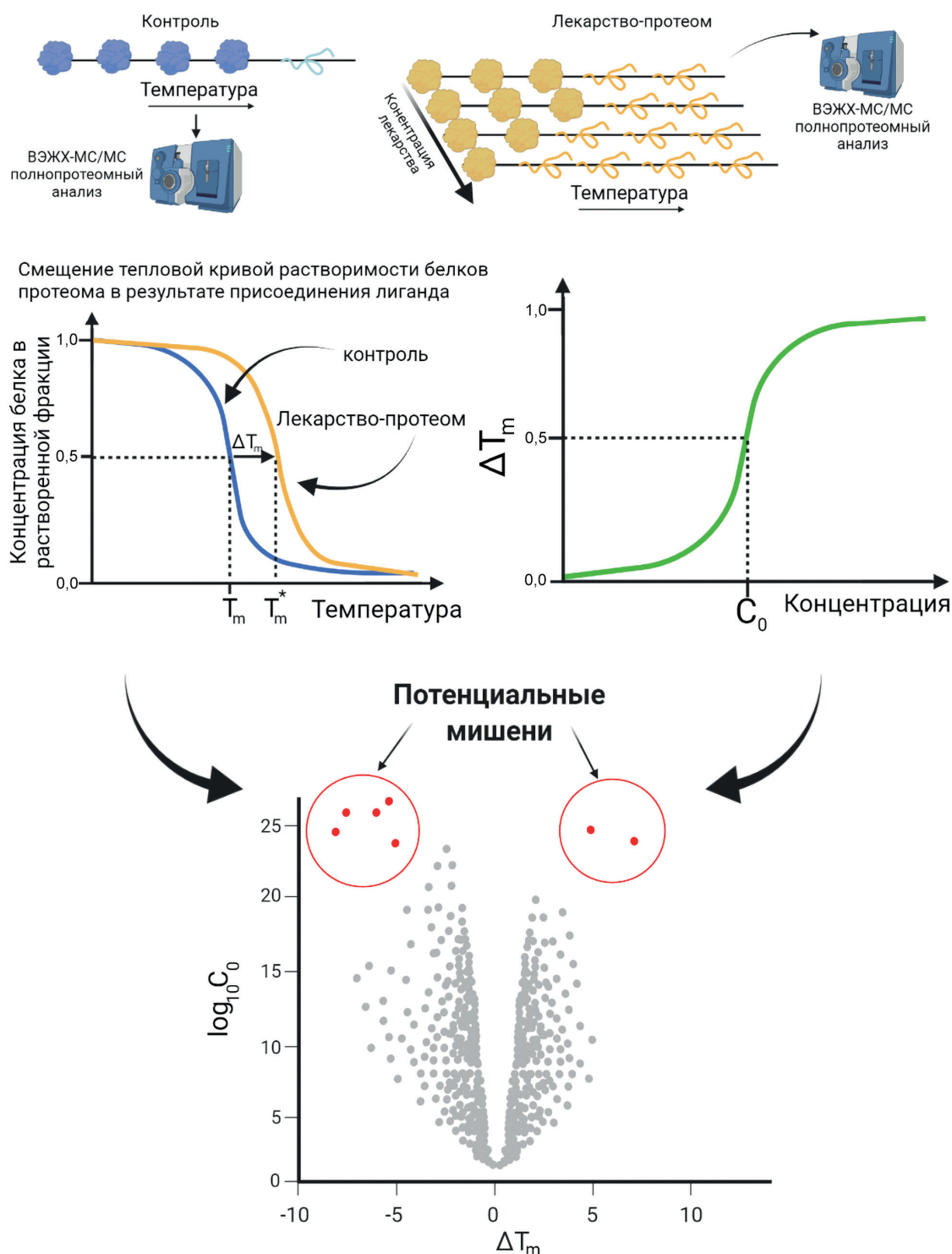
**Температурное профилирование протеомов – новый метод поиска мишеней лекарственного воздействия на основе панорамной масс-спектрометрии.** Метод температурного профилирования протеомов (ТРП) был предложен в 2014 г. Savitski et al. [40] и основан на определении точки денатурации белков при изменении температуры. В результате денатурации белки становятся нерастворимыми в соответствующем буферном растворе. Соответственно, если говорить обо всем протеоме, то происходит разделение всех белков на две фракции: растворимых и нерастворимых при заданной температуре. Если при этом измерять относительную концентрацию всех белков растворимой фазы методом полнопротеомного количественного анализа при разных температурах, то для каждого белка протеома можно построить соответствующую температурную кривую растворимости, как правило, S-образной формы (рис. 3), и определить точку денатурации. Взаимодействие того или иного белка с химическим соединением приводит к изменению точки температурной денатурации таких белков, что проявляется в смещении соответствующих температурных кривых количественных изменений белков в растворимой фазе протеома. Таким образом, полнопротеомный анализ на основе количественной МС дает возможность отслеживания не только каждого уникального состояния белков при взаимодействии с лекарством или другим белком на уровне всего протеома, но и выявления ключевых каскадов белок-белковых взаимодействий, активируемых лекарственным воздействием [46]. Следует отметить, что метод имеет ряд ограничений, в частности, необходимость проведения большого количества полнопротеомных ВЭЖХ-МС/МС-анализов систем «лекарство–протеом» при разных температурах и концентрациях. Так, например, 10 точек по температурам и концентрациям соответствуют 100 фракциям, для каждой из которых требуется осуществлять полнопротеомный количественный анализ,

что потребует несколько недель затрат инструментального времени. Еще одной проблемой метода является потребность в большом количестве клеток для анализа одной такой системы «лекарство–протеом» – от  $10^5$  до  $10^6$  клеток на каждую точку сканирования. Хотя процесс денатурации белка считается двухстадийным переходом от свернутого нативного состояния к структуре случайного клубка, часто существуют промежуточные продукты, которые могут приводить к взаимодействию лекарства *in vitro* в процессе пробоподготовки с белками, которые в действительности не являются его мишенями *in vivo*. С другой стороны, сигмоидальная подгонка кривых плавления белков приводит к тому, что белки, для которых такая форма не является характерной, «выпадают» из анализа, что увеличивает риск пропуска важных мишеней.

**Структурно-зависимые методы химической протеомики.** Одним из следствий связывания белков с лигандами является изменение их конформационной динамики [48]. На этом свойстве основаны так называемые структурно-зависимые методы поиска белков-мишеней, в которых эти изменения измеряются масс-спектрометрически (рис. 2).

Одним из наиболее распространенных структурно-зависимых методов является МС водородно-дейтериевого обмена (Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry, HDX-MS), который в последние годы стал рутинной технологией для исследования структуры и динамики белков в растворах. В методе измеряется обмен дейтерия с водородом в амидной группе основной цепи белка [49, 50]. Водород в амидной группе белковой цепи обменивается с водородом в воде со скоростью, которая зависит от окружения амидной группы и связана с динамикой белка. При этом водород, участвующий во взаимодействиях белок–лиганд, демонстрирует более медленный обмен. Скорость реакции обмена в основной цепи происходит в экспериментально доступной временной шкале, соответственно, информацию о структуре и динамике белка можно получить, наблюдая зависящее от времени включение дейтерия в положение водорода в амидной группе посредством инкубации в дейтерированной воде. Таким образом, в результате связывания лиганда с белком меняется кинетика водородно-дейтериевого обмена, которую можно наблюдать в виде сдвига кинетической кривой при измерении скорости реакции обмена либо во времени, либо при различной кислотности раствора, в котором протекает эта реакция (рис. 2). Количественно эффективность обмена про-





**Рис. 3.** Иллюстрация метода температурного профилирования протеомов. Клеточный лизат предварительно разделяют на несколько проб, каждая из которых обрабатывается анализируемым препаратом в разных концентрациях. Клеточный лизис осуществляется методом «заморозки-разморозки» (freeze-thaw [47]) с целью сохранения нативной формы белков. В результате обработки те из белков протеома, к которым присоединилось лекарство, изменяют свои термодинамические свойства. Каждую из «концентрационных» проб снова функционируют с последующей инкубацией каждой из фракций при разных температурах в диапазоне 37–67 °С (как правило, до 10 температурных точек). После инкубации ультрацентрифугированием выделяют растворенную в буферном растворе белковую фракцию с последующим количественным полнопротеомным анализом с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Для каждого белка анализируемой системы «лекарство–протеом» строится кривая количественных изменений (кривая растворимости) в координатах (температура, концентрация), которая сравнивается с кривой растворимости этого белка в контрольной пробе, не обработанной лекарством. Статистический анализ на значимость сдвигов температурных кривых растворимости, представленный в виде диаграмм рассеяния, позволяет выявить белки со статистически значимыми изменениями температурных точек денатурации, которые и являются белками-мишенями для исследуемого лекарства

является в сдвиге массы белка или суммарном сдвиге массы его протеолитических пептидов в масс-спектрах. Таким образом, можно осуществлять измерения для всех белков протеома в рамках стандартного полнопротеомного ВЭЖХ-МС/МС-анализа и выявлять взаимодействия белок–лиганд [51, 52]. Одной из проблем метода HDX-MS является его довольно низкая чувствительность, в результате многие из мишеней лиганда остаются вне рамок анализа. Для решения этой проблемы был предложен так называемый гистидин-водородно-дейтериевый обмен (His-HDX). В основе этого подхода лежит обогащение протеолитических смесей гистидин-содержащими пептидами с последующим анализом обогащенной смеси стандартным ВЭЖХ-МС/МС. В частности, этот подход был успешно продемонстрирован для выявления взаимодействий между митоген-активируемой протеинкиназой MARK14 и ее ингибитором в лизатах клеток HEK293 [53].

Еще одним набирающим популярность в последние годы структурно-зависимым методом является ограниченный протеолиз в сочетании с МС-детектированием (Limited Proteolysis-Coupled Mass Spectrometry, LiP-MS [54]). Метод основан на предположении о том, что в результате присоединения лиганда к белку меняется профиль протеолитических пептидов последнего в результате гидролиза высокоспецифичными ферментами. Важной особенностью метода является проведение именно ограниченного протеолиза, не проводя гидролиз полностью, что привело бы к потере информации о связанном с лигандом белке. После проведения ограниченного протеолиза образцы анализируют с помощью МС с целью идентификации белков и оценки изменений в профилях их протеолитических пептидов [55]. Следует отметить, что одним из недостатков метода LiP-MS является длительность пробоподготовки [54], а также невысокая специфичность [56].

**Методы и подходы ультракороткой количественной протеомики.** Как уже отмечалось выше, решение задач химической протеомики в контексте поиска мишеней лекарственного воздействия на уровне всего протеома требует проведения большого количества полнопротеомных анализов. Так, в случае использования метода TPP речь идет о десятках и сотнях анализов только для одной системы «лекарство–протеом». Даже в случае использования альтернативных методов разнообразие возможных химиотерапевтических средств и подходов, а также персонализированный отклик протеомов клеток на их использование требуют значительных затрат инструментального времени.

Одним из наиболее широко используемых решений проблемы производительности полнопротеомного анализа является мультиплексинг проб на основе изобарных меток (Tandem Mass Tags, TMT), позволяющий одновременно анализировать несколько протеомов в рамках одного ВЭЖХ-МС/МС-эксперимента [57]. Метод заключается в присоединении к протеолитическим пептидам каждой из проб изобарных меток одной массы, в состав которых входят так называемые «репортерные» части, отличные по массе. Меченые таким образом пептиды разных проб объединяются в одну, однако в процессе анализа при фрагментации конкретного пептида происходит диссоциация не только самого пептида, но и его «репортерной» части TMT-метки. В спектре фрагментации пептида, на основе которого происходит его идентификация, присутствует также и спектр ионов-репортеров метки, относительные интенсивности которых соответствуют относительным интенсивностям данного пептида в разных пробах и, соответственно, относительным концентрациям белка, которому данный пептид соответствует. Реализация 10-плексного протеомного анализа [58] позволяет, таким образом, на порядок сократить затраты инструментального времени на количественный протеомный анализ каждой пробы.

С целью дальнейшего сокращения времени анализа в задачах химической протеомики в недавней работе Gaetani et al. [59] был представлен новый метод, так называемого интегрального изменения растворимости белков (Protein Integral Solubility Alteration, PISA). В анализе PISA объединяются образцы по всему температурному градиенту. Содержание белка в объединенном образце, которое представляет собой площадь под кривой плавления, используется для измерения влияния лиганда на термостабильность белка. Основной метрикой в методе PISA является показатель разницы между площадями под кривыми плавления обработанных и контрольных образцов ( $\Delta S_m$ ). Также такой метрикой может служить кратность изменений белков в объединенных обработанных образцах по сравнению с интегральными контрольными образцами. Как  $\Delta S_m$ , так и кратность изменения связаны со сдвигом температур плавления ( $\Delta T_m$ ) и, следовательно, с изменением термостабильности белка. В анализе PISA экспериментальная  $\Delta S_m$  аппроксимируется путем нормализации этой разницы между обработанными и контрольными образцами по контрольным образцам, в то время как кратные изменения не требуют дополнительной нормализации данных. Метод PISA позволяет

дополнительно сократить время анализа одной системы «лекарство—протеом» на порядок.

Объединения фракций в перечисленных выше подходах дает двойной выигрыш: во-первых, значительно увеличивается производительность анализа одной системы «лекарство—протеом» и, во-вторых, существенно сокращается расход образца. Например, использование мультиплексных TMT-меток в сочетании с методом PISA позволяет на два порядка сократить затраты инструментального времени в задачах химической протеомики на основе температурного полнопротеомного профилирования. Недавно представленные реагенты TMTpro для количественного полнопротеомного анализа позволяют использовать 16–18 интегральных образцов в одном эксперименте [60].

Основной проблемой метода температурного полнопротеомного профилирования и его модификаций является то, что он основан на сигмоидальной форме кривых плавления белков. Однако существует большая группа белков, для которых это условие не выполняется, и кривые плавления не могут быть воспроизведены с достаточно высокой точностью для измерения соответствующего сдвига в температуре денатурации [61], что потенциально может служить источником ложноположительных результатов в определении мишеней лекарственного воздействия. Также количество белков во фракциях резко снижается при высоких температурах, особенно белков с низкими температурами денатурации ( $T_m$ ), что потенциально затрудняет обнаружение соответствующего сдвига [62]. В свою очередь, использование более узкого диапазона температур для построения кривых плавления также повышает риски пропуска целевых белков лекарственного воздействия.

Как уже отмечалось выше, при использовании мультиплексного и интегрального подходов затраты инструментального времени для одной системы «лекарство—протеом» в методе TPP сокращаются на два и более порядков. Однако даже в этом случае разнообразие как групп лекарств, так и объектов их воздействия настолько велико, что проблема дальнейшего повышения производительности полнопротеомного анализа по-прежнему остается критически важной в задачах химической протеомики.

Первые работы по разработке методов ультракороткого полнопротеомного анализа для широкомасштабных скрининговых исследований в области сравнительной протеомики появились буквально в последние несколько лет [63–66]. Среди них метод прямой масс-спектрометрической идентификации белков DirectMS1 является одним из подходов к

реализации быстрого количественного полнопротеомного анализа за счет возможности использования ультракоротких градиентов разделения протеолитических смесей [67]. Понятие «прямая» подразумевает исключение стадии последовательного получения масс-спектров фрагментации протеолитических пептидов смеси, являющейся одной из основных причин увеличения затрат инструментального времени или уменьшения глубины анализа при использовании коротких градиентов разделения. При этом прямая идентификация белков осуществляется за счет использования всей совокупности экспериментальных данных о пептидах, комплементарных к масс-спектрометрическим, в частности, хроматографическим временам или ионной подвижности, а также специфических особенностей последовательностей белков, которым эти пептиды соответствуют. Существенными составляющими метода являются программные средства для обработки масс-спектров ионов пептидов и идентификации их изотопных кластеров [68], ранжирование идентификаций, соотнесение их с белками в соответствующих базах данных и определение уровня достоверности [69]. Важно, что в отличие от подходов, основанных на MS/MS, метод DirectMS1 позволяет идентифицировать белки с существенно (почти на порядок) большим покрытием последовательности, что, в свою очередь, дает более точные измерения относительного содержания белков в пробах на основе измерения интенсивностей спектров ионов, соответствующих этим белкам пептидов. Как было показано в недавних работах, метод позволяет в настоящее время количественно идентифицировать более 2000 белков протеомов в рамках 5-минутного хроматомасс-спектрометрического эксперимента [70].

Еще одним методом ультракороткого полнопротеомного количественного анализа является метод ScanningSWATH, основанный на одновременной фрагментации ионов пептидов смесей в широком окне отношений масс к заряду ( $m/z$ ), так называемом методе слепого сбора данных фрагментации (Data Independent Acquisition, DIA) с одновременным непрерывным сканированием окна фрагментации. Используя непрерывное сканирование окна фрагментации прекурсорных ионов пептидов, метод продемонстрировал возможности его использования в режиме ультракоротких, порядка 0,5–5 мин, градиентов разделения протеолитических смесей пептидов при высокой глубине анализа протеомов клеточных линий человека, достигающей в отдельных экспериментах нескольких тысяч белков [71, 72].



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химическая протеомика на основе количественного профилирования протеомов является в настоящее время основным методом выявления белков-мишеней лекарственного воздействия. В то время как на ранней стадии своего развития химическая протеомика внесла существенный вклад в понимание механизмов действия конкретных классов ферментов и выявление белков-мишеней специфического взаимодействия с различными классами химических соединений, большая часть протеома организма до сих пор оставалась за рамками этих работ. В то время как аффинная хроматография продолжает широко использоваться в таких исследованиях, доминирующими подходами в настоящее время становятся методы, основанные на количественном полнопротеомном анализе с использованием МС высокого разрешения. В первую очередь это относится к так называемой «лекарство-центричной» области химической протеомики, задачей которой является поиск всех возможных мишеней специфического и неспецифического взаимодействия анализируемого соединения на уровне всего протеома клетки. Развитие новых методов ультрабыстрого протеомного анализа позволяет масштабировать решение основных задач химической протеомики по поиску мишеней лекарственного воздействия и разработке новых химиотерапевтических подходов к лечению социально-значимых заболеваний человека. Среди методов химической протеомики, которые особенно активно развивались в последние годы, следует выделить методы, основанные на измерении малых изменений в конформации или стабильности белков, с которыми связался лиганд (такие как TPP, HDX-MS и LiP-MS) и которые не требуют дополнительной дериватизации исследуемого химического соединения. Большинство методов не решают проблему поиска мишеней лекарственного воздействия среди мембранных белков, поскольку, как правило, лекарства образуют с ними слабые, нековалентные связи, и соответствующий эффект в изменении той же термической стабильности белка становится

ниже порога чувствительности измерений. Кроме того, в структурно-зависимых методах ставится задача поиска взаимодействий лекарств с неденатурированными последовательностями белков в их нативной форме, и клеточный лизис осуществляется с использованием соответствующих методик, таких как «заморозка-разморозка» при криогенных температурах. В этом случае, как правило, идет потеря мембранных белков. Решение этих проблем видится в использовании методов, основанных на фотоиндуцированном связывании белков, в первую очередь ССМС, в котором анализируемый лиганд дериватизируется добавлением фотореагирующей группы, которая под действием УФ-излучения образует ковалентные связи с аминокислотными остатками белка-мишени лиганда. В целом, высокопроизводительный полнопротеомный МС-анализ позволяет не только решать в короткие сроки задачи поиска всех возможных мишеней лекарственного воздействия для быстрорастущего разнообразия разрабатываемых химиотерапевтических препаратов, но использовать методы химической протеомики в таких перспективных областях исследований, как перепрограммирование существующих лекарств и персонализированный подбор лекарств с заданными терапевтическими свойствами.

**Вклад авторов.** И.И. Федоров, В.И. Линева – подбор и анализ литературы по теме обзора, написание текста обзора; И.А. Тарасова – обсуждение темы обзора и описываемых методов; М.В. Горшков – руководство работой над обзором, написание и редактирование текста.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00229).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность профессору РАН С.А. Мошковскому за плодотворное обсуждение темы обзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schutte, M., Ogilvie, L. A., Rieke, D. T., Lange, B. M. H., Yaspo, M. L., et al. (2017) Cancer precision medicine: why more is more and DNA is not enough, *Public Health Genomics*, **20**, 70-80, doi:10.1159/000477157.
2. Frieri, M., Kumar, K., and Boutin, A. (2017) Antibiotic resistance, *J. Infect. Public Health*, **10**, 369-378, doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
3. Vasan, N., Baselga, J., and Hyman, D. M. (2019) A view on drug resistance in cancer, *Nature*, **575**, 299-309, doi: 10.1038/s41586-019-1730-1.
4. Ramos, A., Sadeghi, S., and Tabatabaiean, H. (2021)

- Battling chemoresistance in cancer: root causes and strategies to uproot them, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9451, doi: 10.3390/ijms22179451.
5. Ashley, E. A. (2016) Towards precision medicine. *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 507-522, doi: 10.1038/nrg.2016.86.
  6. Mroz, E. A., and Rocco, J. W. (2017) The challenges of tumor genetic diversity, *Cancer*, **123**, 917-927, doi: 10.1002/cncr.30430.
  7. Rix, U., and Superti-Furga, G. (2009) Target profiling of small molecules by chemical proteomics, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 616-624, doi: 10.1038/nchembio.216.
  8. Wright, M. H., and Sieber, S. A. (2016) Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products, *Nat. Prod. Rep.*, **33**, 681-708, doi: 10.1039/c6np00001k.
  9. Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftexhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., et al. (2020) Affinity chromatography: a review of trends and developments over the past 50 years, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1157**, 122332, doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122332.
  10. Huang, F., Zhang, B., Zhou, S., Zhao, X., Bian, C., et al. (2012), Chemical proteomics: terra incognita for novel drug target profiling, *Chinese J. Cancer*, **31**, 507-518, doi: 10.5732/cjc.011.10377.
  11. Pfab, C., Schnobrich, L., Eldnasoury, S., Gessner, A., and El-Najjar, N. (2021) Repurposing of antimicrobial agents for cancer therapy: what do we know? *Cancers (Basel)*, **13**, 3193, doi: 10.3390/cancers13133193.
  12. Kamel, H. F. M., and Al-Amodi, H. S. A. B. (2017) Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **15**, 220-235, doi: 10.1016/j.gpb.2016.11.005.
  13. Sneha, P., and Doss, C. G. (2016) Molecular dynamics: new frontier in personalized medicine, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **102**, 181-224, doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.09.004.
  14. Siwy, J., Mischak, H., and Zürbig, P. (2019) Proteomics and personalized medicine: a focus on kidney disease, *Exp. Rev. Proteomics*, **16**, 773-782, doi: 10.1080/14789450.2019.1659138.
  15. Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M., and Bantscheff, M. (2022) The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, doi: 10.1038/s41573-022-00409-3, in press.
  16. Corson, T. W., and Crews, C. M. (2007) Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials, *Cell*, **130**, 769-774, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.021.
  17. Aebersold, R., and Mann, M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature*, **537**, 347-355, doi: 10.1038/nature19949.
  18. Chernobrovkin, A., Marin-Vicente, C., Visa, N., and Zubarev, R. A. (2015) Functional identification of target by expression proteomics (FITeXP) reveals protein targets and highlights mechanisms of action of small molecule drugs, *Sci. Rep.*, **5**, 11176, doi: 10.1038/srep11176.
  19. Saei, A. A., Beusch, C. M., Chernobrovkin, A., Sabatier, P., Zhang, B., et al. (2019) ProTargetMiner as a proteome signature library of anticancer molecules for functional discovery, *Nat. Commun.*, **10**, 5715, doi: 10.1038/s41467-019-13582-8.
  20. Ruprecht, B., Di Bernardo, J., Wang, Z., Mo, X., Ursu, O., et al. (2020) A mass spectrometry-based proteome map of drug action in lung cancer cell lines, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1111-1119, doi: 10.1038/s41589-020-0572-3.
  21. Schubert, O., Röst, H., Collins, B., Rosenberger, G., and Aebersold, R. (2017) Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research, *Nat. Protoc.*, **12**, 1289-1294, doi: 10.1038/nprot.2017.040.
  22. Cuatrecasas, P. (1970) Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059-3065, doi: 10.1016/S0021-9258(18)63022-4.
  23. Lolli, G., Thaler, F., Valsasina, B., Roletto, F., Knapp, S., et al. (2003) Inhibitor affinity chromatography: profiling the specific reactivity of the proteome with immobilized molecules, *Proteomics*, **3**, 1287-1298, doi: 10.1002/pmic.200300431.
  24. McMasters, D. R. (2018) Knowledge-based approaches to off-target screening, *Methods Enzymol.*, **610**, 311-323, doi: 10.1016/bs.mie.2018.09.023.
  25. Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (2015) Western blotting: an introduction, *Methods Mol. Biol.*, **1312**, 17-30, doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7\_5.
  26. Dudley, E. (2019) MALDI profiling and applications in medicine, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1140**, 27-43, doi: 10.1007/978-3-030-15950-4\_2.
  27. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., and Yates, J. R. 3rd (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chem. Rev.*, **113**, 2343-2394, doi: 10.1021/cr3003533.
  28. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*, **258**, 598-599, doi: 10.1038/258598a0.
  29. Sun, X., Chiu, J.-F., and He, Q.-Y. (2005) Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics, *Expert Rev. Proteomics*, **2**, 649-657, doi: 10.1586/14789450.2.5.649.
  30. Ong, S. E., Schenone, M., Margolin, A. A., Li, X., Do, K., et al. (2009) Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4617-4622, doi: 10.1073/pnas.0900191106.
  31. Sanman, L. E., and Bogyo, M. (2014) Activity-based profiling of proteases, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 249-273, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035352.
  32. Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M., and Cravatt, B. F. (2004) Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10000-10005, doi: 10.1073/pnas.0402784101.
  33. Lone, A. M., Bachovchin, D. A., Westwood, D., Speers, A. E., Timothy, P., et al. (2012) A substrate-free activity-based protein profiling screen for the discovery of selective PREPL inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11665-11674, doi: 10.1021/ja2036095.

34. Greenbaum, D. C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradsky, K. F., et al. (2002) A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite, *Science*, **298**, 2002-2006, doi: 10.1126/science.1077426.
35. Singaravelu, R., Blais, D. R., McKay, C. S., and Pezacki, J. P. (2010) Activity-based protein profiling of the hepatitis C virus replication in Huh-7 hepatoma cells using a non-directed active site probe, *Proteome Sci.*, **8**, 5, doi: 10.1186/1477-5956-8-5.
36. Torkamani, A., and Schork, N. J. (2007) Distribution analysis of nonsynonymous polymorphisms within the human kinase gene family, *Genomics*, **90**, 49-58, doi: 10.1016/j.ygeno.2007.03.006.
37. Hubbard, M. J., and Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 172-177, doi: 10.1016/0968-0004(93)90109-z.
38. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling, *Nature*, **411**, 355-365, doi: 10.1038/35077225.
39. Valsasina, B., Kalisz, H. M., and Isacchi, A. (2004) Kinase selectivity profiling by inhibitor affinity chromatography, *Expert Rev. Proteomics*, **1**, 303-315, doi: 10.1586/14789450.1.3.303.
40. Savitski, M. M., Reinhard, F. B. M., Franken, H., Werner, T., Savitski, M. F., et al. (2014) Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome, *Science*, **346**, 1255784, doi: 10.1126/science.1255784.
41. Köster, H., Little, D. P., Luan, P., Muller, R., Siddiqi, S. M., et al. (2007) Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions, *Assay Drug Dev. Technol.*, **5**, 381-390, doi: 10.1089/adt.2006.039.
42. Fischer, J. J., Michaelis, S., Schrey, A. K., Graebner, O. G., Glinski, M., et al. (2010) Capture compound mass spectrometry sheds light on the molecular mechanisms of liver toxicity of two Parkinson drugs, *Toxicol. Sci.*, **113**, 243-253, doi: 10.1093/toxsci/kfp236.
43. Assal, F., Spahr, L., Hadengue, A., Rubbia-Brandt, L., and Burkhard, P. R. (1998) Tolcapone and fulminant hepatitis, *Lancet*, **352**, 958, doi: 10.1016/S0140-6736(05)61511-5.
44. Silva, T. B., Borges, F., Serrão, M. P., and Soares-da-Silva, P. (2020) Liver says no: the ongoing search for safe catechol O-methyltransferase inhibitors to replace tolcapone, *Drug Discov. Today*, **25**, 1846-1854, doi: 10.1016/j.drudis.2020.07.015.
45. Artusi, C. A., Sarro, L., Imbalzano, G., Fabbri, M., and Lopiano, L. (2021) Safety and efficacy of tolcapone in Parkinson's disease: systematic review, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **77**, 817-829, doi: 10.1007/s00228-020-03081-x.
46. Mateus, A., Kurzawa, N., Becher, I., Sridharan, S., Helm, D., et al. (2020) Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions, *Mol. Syst. Biol.*, **16**, e9232, doi: 10.15252/msb.20199232.
47. Tansey, W.P. (2006) Freeze-thaw lysis for extraction of proteins from mammalian cells, *CSH Protoc.*, **2006**, pdb.prot4614, doi: 10.1101/pdb.prot4614.
48. De Souza, N., and Picotti, P. (2020) Mass spectrometry analysis of the structural proteome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **60**, 57-65, doi: 10.1016/j.sbi.2019.10.006.
49. James, E. I., Murphree, T. A., Vorauer, C., Engen, R., and Guttman, M. (2022) Advances in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and the pursuit of challenging biological systems, *Chem. Rev.*, **122**, 7562-7623, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00279.
50. Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., and Abzalimov, R. R. (2013) Mass spectrometry-based methods to study protein architecture and dynamics, *Protein Sci.*, **22**, 530-544, doi: 10.1002/pro.2238.
51. Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., and Abzalimov, R. R. (2009) H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: is there a need for a top-down approach? *Anal. Chem.*, **81**, 7892-7899, doi: 10.1021/ac901366n.
52. Campobasso, N., and Huddler, D. (2015) Hydrogen deuterium mass spectrometry in drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3771-3776, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.07.007.
53. Miyagi, M., Tanaka, K., Watanabe, S., Kondo, J., and Kishimoto, T. (2021) Identifying protein-drug interactions in cell lysates using histidine hydrogen deuterium exchange, *Anal. Chem.*, **93**, 14985-14995, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02283.
54. Schopper, S., Kahraman, A., Leuenberger, P., Feng, Y., Piazza, I., et al. (2017) Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry, *Nat. Protocols*, **12**, 2391-2410, doi: 10.1038/nprot.2017.100.
55. Cheng, K. W., Wong, C. C., Wang, M., He, Q. Y., and Chen, F. (2010) Identification and characterization of molecular targets of natural products by mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 126-155, doi: 10.1002/mas.20235.
56. Pepelnjak, M., de Souza, N., and Picotti, P. (2020) Detecting protein-small molecule interactions Using limited proteolysis-mass spectrometry (LiP-MS), *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 919-920, doi: 10.1016/j.tibs.2020.05.006.
57. Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., et al. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem.*, **75**, 1895-1904, doi: 10.1021/ac0262560.
58. Werner, T., Sweetman, G., Savitski, M. F., Mathieson, T., Bantscheff, M., et al. (2014) Ion coalescence of neutron encoded TMT 10-plex reporter ions, *Anal. Chem.*, **86**, 3594-3601, doi: 10.1021/ac500140S.
59. Gaetani, M., Sabatier, P., Saei, A. A., Beusch, C. M., Yang, Z., et al. (2019) Proteome integral solubility alteration: a high-throughput proteomics assay for target deconvolution, *J. Proteome Res.*, **18**, 4027-4037, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00500.
60. Li, J., Van Vranken, J. G., Pontano Vaites, L., Schweppe, D. K., Huttlin, E. L., et al. (2020) TMTpreagents: a set of isobaric labeling mass tags enables simultaneous proteome-wide measurements across 16 samples, *Nat. Methods*, **17**, 399-404, doi: 10.1038/s41592-020-0781-4.



61. Dai, L., Prabhu, N., Yu, L. Y., Bacanu, S., Ramos, A. D., et al. (2019) Horizontal cell biology: monitoring global changes of protein interaction states with the proteome-wide Cellular Thermal Shift Assay (CETSA), *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 383-408, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012837.
62. Li, J., Van Vranken, J. G., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., and Gygi, S. P. (2020) Selection of heating temperatures improves the sensitivity of the proteome integral solubility alteration assay, *J. Proteome Res.*, **19**, 2159-2166, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00063.
63. Bekker-Jensen, D. B., Kelstrup, C. D., Batth, T. S., Larsen, S. C., Haldrup, C., et al. (2017) An optimized shotgun strategy for the rapid generation of comprehensive human proteomes, *Cell Syst.*, **4**, 587-599.e4, doi: 10.1016/j.cels.2017.05.009.
64. Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J., and Mann, M. (2018) BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes, *Nat. Methods*, **15**, 440-448, doi: 10.1038/s41592-018-0003-5.
65. Bache, N., Geyer, P. E., Bekker-Jensen, D. B., Hoerning, O., Falkenby, L., et al. (2018) A novel LC system embeds analytes in pre-formed gradients for rapid, ultra-robust proteomics, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 2284-2296, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000853.
66. Meier, F., Brunner, A. D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., et al. (2018) Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer, *Mol. Cell Proteomics*, **17**, 2534-2545, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
67. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., et al. (2017) MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
68. Teلمان, J., Chawade, A., Sandin, M., Levander, F., and Malmstrom, J. (2016) Dinosaur: a refined open-source peptide MS feature detector, *J. Proteome Res.*, **15**, 2143-2151, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00016.
69. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell Proteomics*, **16**, 936-948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
70. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., et al. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Prot. Res.*, **20**, 1864-1873, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00863.
71. Messner, C. B., Demichev, V., Bloomfield, N., Yu, J. S. L., White, M., et al. (2021) Ultra-fast proteomics with scanning SWATH, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 846-854, doi: 10.1038/s41587-021-00860-4.
72. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., and Ralser, M. (2020) DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput, *Nat. Methods*, **17**, 41-44, doi: 10.1038/s41592-019-0638-x.

## MASS SPECTROMETRY-BASED CHEMICAL PROTEOMICS FOR DRUG TARGET DISCOVERIES

### Mini-Review

I. I. Fedorov<sup>1,2</sup>, V. I. Lineva<sup>2</sup>, I. A. Tarasova<sup>1</sup>, and M. V. Gorshkov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; E-mail: mike.gorshkov@gmail.com

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National University), 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Chemical proteomics, emerging rapidly in recent years, has become a main approach to identifying interactions between the small molecules and proteins in the cells on a proteome scale and mapping the signaling and/or metabolic pathways activated and regulated by these interactions. The methods of chemical proteomics allow not only identifying proteins targeted by drugs, characterizing their toxicity and discovering possible off-target proteins, but also elucidation of the fundamental mechanisms of cell functioning under conditions of drug exposure or due to the changes in physiological state of the organism itself. Solving these problems is essential for both basic research in biology and clinical practice, including approaches to early diagnosis of various forms of serious diseases or prediction of the effectiveness of therapeutic treatment. At the same time, recent developments in high-resolution mass spectrometry have provided the technology for searching the drug targets across the whole cell proteomes. This review provides a concise description of the main objectives and problems of mass spectrometry-based chemical proteomics, the methods and approaches to their solution, and examples of implementation of these methods in biomedical research.

**Keywords:** chemical proteomics, mass-spectrometry, drug targets

## РЕКОМБИНАНТНАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗА ИЗ *Nocardioides simplex*

© 2022 В.В. Фокина<sup>1\*</sup>, М.В. Карпов<sup>1</sup>, В.В. Коллеров<sup>1</sup>, Е.Ю. Брагин<sup>1</sup>,  
Д.О. Эпиктетов<sup>1</sup>, А.В. Свиридов<sup>1</sup>, А.В. Казанцев<sup>2</sup>, А.А. Шутов<sup>1</sup>, М.В. Донова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: 2vvfokina@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.07.2022

После доработки 01.08.2022

Принята к публикации 01.08.2022

Холестериноксидаза (ХО) – фермент, крайне востребованный в медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве, химии и биотехнологии. ХО катализирует окисление 3 $\beta$ -гидрокси-5- $\alpha$ -фрагмента стероидного ядра с формированием продукта с 3-кето-4- $\alpha$ -структурой и образованием перекиси водорода. Объектом исследования являлась внеклеточная ХО актинобактериального штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д. Зрелая форма ХО *N. simplex* (55,6 кДа) с 6xHis-меткой была получена путём экспрессии в клетках *Escherichia coli* соответствующей нуклеотидной последовательности. Выделение и очистку рекомбинантной ХО *N. simplex* (ХО<sub>NS</sub>) проводили с помощью аффинной хроматографии. Фермент проявлял активность по отношению к холестерину, холестеранолу, фитостерину, прегненолону и дегидроэпиандростерону. Активность ХО зависела от структуры и длины алифатической боковой цепи при С17 стероида и была ниже для прегненолона и дегидроэпиандростерона. ХО<sub>NS</sub> проявляла активность в диапазоне рН 5,25÷6,5 с оптимумом рН 6,0. Анализ кинетических характеристик и тестов на стабильность при хранении показал, что показатели ХО<sub>NS</sub> сравнимы или превосходят таковые для коммерческой ХО из *Streptomyces hygroscopicus* (ХО<sub>SH</sub>). Результаты расширяют знания о микробных ХО и свидетельствуют о том, что ХО из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д перспективна для дальнейшего практического применения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** холестерин, холестериноксидаза, актинобактерии, рекомбинантный фермент.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090068, **EDN:** BAVZSL

### ВВЕДЕНИЕ

Холестерин (холест-5- $\alpha$ -3 $\beta$ -ол) играет ключевую роль во множестве биохимических процессов у высших организмов, определение и регуляция уровня холестерина имеют большое значение в медицине. Одним из ферментов, катализирующих на начальном этапе микробной деградации холестерина его превращение в холест-4- $\alpha$ -3-он, является холестерин:кислород-оксидоредуктаза (КФ 1.1.3.6)

Принятые сокращения: АБТС – 2,2-азинодиэтилбенз-тиазолинсульфонат; МЦД – метил- $\beta$ -циклодекстрин; ХО – холестериноксидаза; ХО<sub>NS</sub> – рекомбинантная холестериноксидаза *N. simplex*; ХО<sub>SH</sub> – коммерческая ХО из *Streptomyces hygroscopicus*; SFCA – ацетат целлюлозы без поверхностно-активных веществ.

\* Адресат для корреспонденции.

или холестериноксидаза (ХО), которая запускает каскад реакций, приводящих к разрушению стероидного ядра [1].

ХО представляют собой флавопротеиновые ферменты с двойственной функцией: окисления 3 $\beta$ -гидрокси-фрагмента до 3-оксо-группы и изомеризации двойной связи ( $\Delta^{5(6)} \rightarrow \Delta^{4(5)}$ ) в кольце А стероидного ядра. Реакция изомеризации протекает быстрее, чем высвобождение холест-5- $\alpha$ -3-она из полости ХО, и почти с такой же скоростью, как окисление холестерина [2]. Кофактором фермента является FAD; FADH<sub>2</sub> реагирует с кислородом с образованием перекиси водорода (рис. 1). Цветная реакция с пероксидазой хрена и хромогеном лежит в основе определения холестерина с помощью ХО (рис. 1) [3].

Помимо количественного анализа холестерина в биологических жидкостях, пищевых

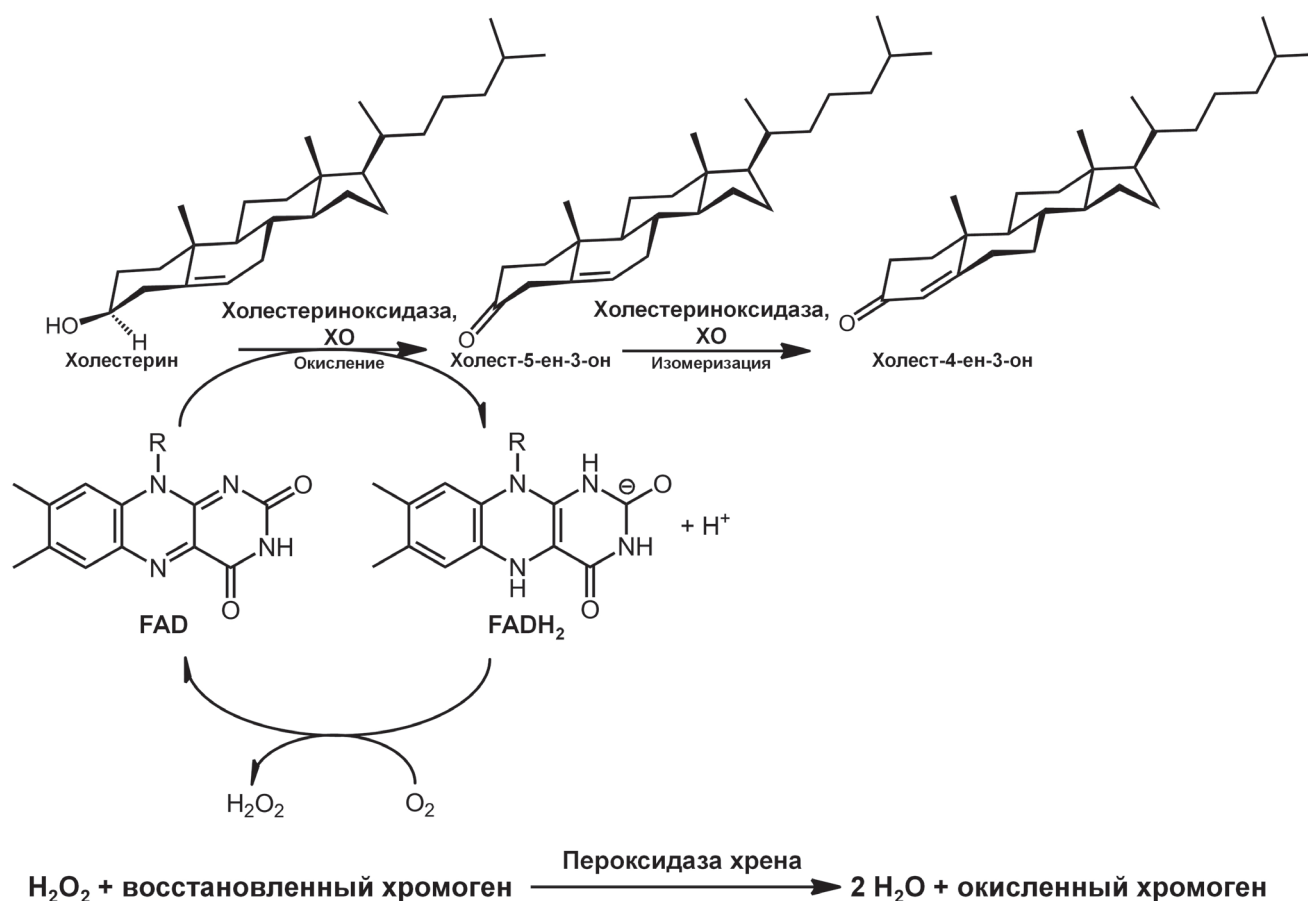


Рис. 1. Окисление холестерина до холест-4-ен-3-она с образованием перекиси водорода холестериноксидазой и цветная реакция перекиси водорода с пероксидазой хрена и хромогеном

продуктах и добавках, ХО широко применяется для биоконверсии стероидных 3 $\beta$ -спиртов в органическом синтезе фармацевтических стероидов [4]. ХО способны к окислению нестероидных аллильных спиртов [5], обладают инсектицидной активностью [6]. Имеются сведения о противоопухолевой активности ХО, которая характеризуется как перспективное природное противораковое средство [7]. Предполагаемый механизм действия ХО основан на превращении холестерина в холестенон с последующим изменением физической структуры клеточных мембран или их повреждением [8].

Наличие ХО описано для аэробных бактерий различного таксономического положения, в основном актинобактерий родов *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycolicibacterium*, *Mycobacterium* [1]. У патогенных видов ХО, предположительно, играют ключевую роль в инфицировании макрофагов хозяина [9]. Ортологи ХО у млекопитающих не выявлены.

Бактериальные ХО, как правило, являются внеклеточными и, в зависимости от микроорганизма, встречаются в секретируемой и/или мембранно-ассоциированной форме.

Секретируемая форма представляет собой растворимый белок, состоящий из двух слиптых доменов: флавин-связывающего и субстрат-связывающего [8]. Наряду с ХО (или вместо ХО) окисление стероидов до соответствующих стенонов у некоторых актинобактерий, таких как *Mycolicibacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 или *Mycobacterium tuberculosis*, обеспечивают 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы (3 $\beta$ -ГСД) [10].

В настоящей работе изучали ХО *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д. Этот промышленно значимый штамм известен главным образом благодаря своей высокой 3-кетостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназной активности по отношению к различным 3-кето-стероидам [11], в то время как его активность по отношению к 3 $\beta$ -гидроксистероидам является менее изученной. При росте штамма на холестерине основной интермедиат был идентифицирован как холестенон. В геноме *N. simplex* не обнаружено гена, кодирующего (3 $\beta$ -ГСД), что позволило предположить, что эту реакцию катализирует ХО [12].

Настоящее исследование направлено на выявление и изучение активности внеклеточ-



ной ХО *N. simplex* Ас-2033Д, получение рекомбинантной ХО (ХО<sub>NS</sub>) и оценку её свойств в сравнении с коммерческой ХО из *Streptomyces hygroscopicus* (ХО<sub>Sh</sub>).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** Стероиды: холестерин, 5 $\alpha$ H-холестанол, прегненолон, дегидроэпиандростерон, холестенон, прогестерон, андростендион были получены от компании «Steraloids» (США); фитостерин (общее содержание стероидов 95,47%) получен от компании «Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co., Ltd.» (Китай). Использовали бромистый этидий («Serva», Германия); метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) («Wacker Chemie», Германия); бактоагар, бактопептон и дрожжевой экстракт («Panreac», Испания); пероксидазу хрена и ХО *Streptomyces hygroscopicus* (ХО<sub>Sh</sub>) («Sigma», США). Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства, квалификации х.ч. или ч.д.а.

**Бактериальные штаммы и условия культивирования.** Штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Штамм культивировали аэробно, как описано ранее [13]. В качестве индукторов оценивали холестерин, фитостерин, дегидроэпиандростерон, которые вносили через 17 ч роста в концентрации 0,02 г/литр в виде метанольного раствора (2 мг/мл).

Штаммы *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  и BL21(DE3) выращивали при 37 °С в среде LB [14]. Для селекции рекомбинантных штаммов и поддержания плазмид использовали канамицин (50 мкг/мл). Для приготовления плотных сред использовали бактоагар (1,5%).

**Анализ ДНК- и белковых последовательностей.** В работе были использованы ДНК- и белковые последовательности ХО *N. simplex* (locus tag: KR76\_09550; GenBank: AIY19828.2, UniProt: A0A0A1DTF1). Сравнение идентичности аминокислотных последовательностей ХО *N. simplex* с ХО других штаммов проводили с помощью программного обеспечения BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Построение филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA5 [15] с использованием метода максимального правдоподобия. Для выравнивания последовательностей ХО использовали алгоритм ClustalW. Для предсказания присутствия в белковой последовательности ХО сигнального пептида и расположения протеолитического сайта расщепления использовали сервис SignalP 6.0 [16].

**Биоконверсия 3 $\beta$ -стероидных спиртов бесклеточной культуральной жидкостью *N. simplex*.** Клетки *N. simplex*, выращенные в течение 20 ч до поглощения ОП<sub>600</sub> ~ 6, осаждали центрифугированием (35 мин, 3000 g, 4 °С), далее супернатант фильтровали с использованием шприцевого мембранного фильтра с диаметром пор 0,20 мкм (SFCA, «Sartorius», Германия). Бесклеточный супернатант тестировали на способность к биоконверсии дегидроэпиандростерона, холестерина, фитостерина, прогестерона, 5 $\alpha$ H-холестанола при их концентрации 0,05 г/литр. Стероиды идентифицировали методом ВЭЖХ, структуру 5 $\alpha$ H-холестанола определяли с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C-ЯМР.

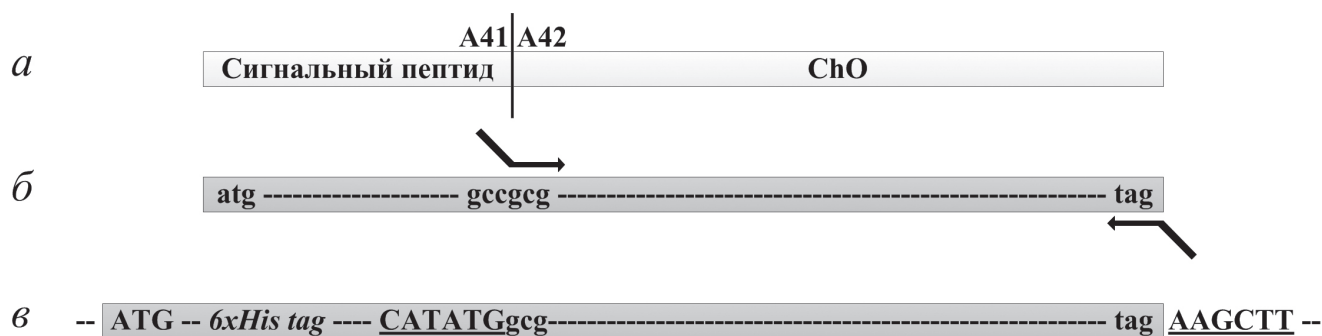
**Клонирование ДНК.** Клонирование ДНК проводили согласно стандартным протоколам [17] и рекомендациям фирм-производителей.

Клетки *N. simplex*, выращенные в среде Нос до поглощения ОП<sub>600</sub> ~ 4,5, осаждали центрифугированием (20 мин, 8000 g, 4 °С), 50 мг клеточного осадка использовали для выделения геномной ДНК с помощью набора AllPrep Bacterial DNA/RNA/Protein Kit («Qiagen», США). Амплификацию целевой ДНК-последовательности, кодирующей усечённую зрелую форму ХО *N. simplex* (42-541 АМК), осуществляли с матрицы геномной ДНК *N. simplex* методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) в присутствии олигонуклеотидных праймеров Cho-f (5'-CAGTACATATGgcgagcatcggaacggcg-3') и Cho-r (5'-TCATCAAGCTTctagatgtcgtggccaggatg-3'), несущих соответствующие сайты эндонуклеаз рестрикции *Nde*I и *Hind*III (подчёркнуто) (рис. 2).

Для получения плазмиды pETCho амплифицированную нуклеотидную последовательность клонировали в вектор pET-28a («MilliporeSigma», США).

**Получение и очистка рекомбинантной ХО<sub>NS</sub>.** Плаزمида pETCho была перенесена в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) методом теплового шока. Культуру рекомбинантных клеток *E. coli* выращивали в двух литрах среды LB с канамицином при 37 °С и 200 об./мин до поглощения ОП<sub>600</sub> ~ 0,5. Биосинтез усечённой зрелой формы ХО *N. simplex* индуцировали внесением в среду ИПТГ (0,5 мМ), дальнейшее культивирование вели при 25 °С в течение 6 ч. Биосинтез рекомбинантных белков контролировали методом электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ в соответствии с протоколом Лэммли [18].

Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием (20 мин, 5000 g, 4 °С), промывали и ресуспендировали в 40 мл буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Клеточную суспензию гомогенизируют



**Рис. 2.** Последовательности белков и ДНК, использованные в работе: а – полноразмерная аминокислотная последовательность ХО *N. simplex*. Вертикальная линия между остатками аланина А41 и А42 показывает сайт протеолитического расщепления ХО в процессе секреции. б – Нуклеотидная последовательность гена *cho* (*KR76\_09550*), кодирующего ХО *N. simplex*. Праймеры изображены стрелками. в – Генетическая конструкция, клонированная в плазмиде pETChO. Сайты узнавания *Nde*I и *Hind*III подчёркнуты

вали на ультразвуковом дезинтеграторе Q500 («Qsonica», США) согласно рекомендациям производителя. Полученный гомогенат обрабатывали препаратом ДНКазы I («Sigma-Aldrich», США), дебрис осаждали (120 мин, 25 000 g, 4 °C), супернатант фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (SFCA, «Sartorius»).

Очистку ХО<sub>Ns</sub> проводили методом аффинной хроматографии на колонке объёмом 5 мл EconoFit Profinity IMAC («Bio-Rad, США), уравновешенной связывающим буфером (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 20 мМ имидазол). После нанесения пробы колонку промывали шестью колоночными объемами (КО) связывающего буфера; белок элюировали десятью КО буфера для элюирования (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 500 мМ имидазол). Фракции, содержащие основную долю активности ХО<sub>Ns</sub>, смешивали, диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и использовали в дальнейшей работе. Наличие и чистоту фермента в пробах контролировали электрофорезом в 12%-ном Ds-Na-ПААГ. Количество белка в исследуемых препаратах определяли с помощью реактива Брэдфорда («Sigma») в соответствии с инструкцией производителя.

**Определение ферментативной активности ХО<sub>Ns</sub>.** Определение ферментативной активности проводили в 2 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,0), 12% ДМСО, 0,6 г/литр 3β-ОН-5-ен-стероид (холестерин, фитостерин, прегненолон, дегидроэпиандростерон, 5αН-холестанол). Реакцию инициировали добавлением 10 мкл ХО<sub>Ns</sub> (0,7 мг/мл) или коммерческого препарата ХО<sub>Sh</sub>, используемого для сравнения. Смесь инкубировали в течение определённого времени при 30 °C, реакцию останавливали кипячением в течение 3 мин. Стероидные продукты анализировали методом ВЭЖХ.

Спектрофотометрически активность ХО<sub>Ns</sub> определяли в 1 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,0), 5 мМ МЦД, 0–1 мМ 3β-ОН-5-ен-стероид (холестерин, фитостерин, прегненолон, дегидроэпиандростерон, 5αН-холестанол), 5 Ед. пероксидазы хрена, 1,4 мМ 2,2-азинодиэтилбензтиазолинсульфонат (АБТС). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл ХО<sub>Ns</sub> (35 мкг/мл) или ХО<sub>Sh</sub> (35 мкг/мл). В качестве контроля использовали аналогичную смесь без внесения препарата ХО. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 420 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония).

**Определение характеристик ХО<sub>Ns</sub>.** Спектр поглощения препарата ХО<sub>Ns</sub> записывали в диапазоне длин волн 190–900 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в кварцевых кюветках, содержащих раствор ХО<sub>Ns</sub> (1,5 мг/мл, 0,03 мМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5). Аналогично записывали спектры поглощения эталонного раствора FAD (0,1 мМ) в указанном буфере и препарата 0,03 мМ ХО<sub>Ns</sub>, инкубированной в течение 10 мин в присутствии 0,5% Ds-Na.

Зависимость активности ХО<sub>Ns</sub> от концентрации субстрата исследовали спектрофотометрически в реакционных средах с холестерином, фитостерином, прегненолоном, дегидроэпиандростероном, 5αН-холестанолом в диапазоне концентраций 0,05–1 мМ.

Скорость окисления холестерина ХО<sub>Ns</sub> определяли спектрофотометрически в диапазоне pH 5,0–9,0 с шагом 0,25 единиц в универсальном буфере Бриттона–Робинсона (Britton–Robinson, [19]) и в диапазоне pH 6,0–8,0 с шагом 0,5 единиц – в Na-фосфатном буфере. Реакционная смесь конечным объёмом 1 мл содержала 50 мМ буфер, ферментный препарат ХО<sub>Ns</sub>, 5 мМ МЦД, 0,5 мМ холестерин,

1,4 мМ АБТС и 15 Ед. пероксидазы хрена. Вне-сение трёхкратного количества пероксидазы выполнялось для компенсации снижения активности этого фермента при кислых и щелочных значениях рН [20].

Для изучения стабильности  $\text{ХО}_{Ns}$  при длительном хранении препарата  $\text{ХО}_{Ns}$  инкубировали в Na-фосфатном буфере (рН 7,0) при 4 и 25 °С. Остаточную активность  $\text{ХО}_{Ns}$  по отношению к холестерину измеряли спектрофотометрически через известные промежутки времени от начала эксперимента и выражали в процентах от исходной активности.

Активность  $\text{ХО}_{Ns}$  определяли при различных температурах (20–50 °С) для определения оптимума активности рекомбинантного фермента.

**Тонкослойная хроматография (ТСХ).** Стероиды экстрагировали этилацетатом, экстракты наносили на ТСХ-пластинки ALUGRAM SIL G/UV254 («MACHEREY-NAGEL», Германия) и разделяли в системе бензол/ацетон (3/1, (v/v)). 3-Кето-4-ен-стероиды визуализировали в УФ свете при длине волны 254 нм в хемископе CN-15MC UV Darkroom («Vilber Lourmat», Франция).

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** Аликвоту реакционной смеси разводили в два раза смесью ацетонитрил/изопропанол (50/45, (v/v)), если в качестве субстратов использовали стеринны, или ацетонитрилом, если использовали прегненолон/ДГЭА. Суспензию центрифугировали (10 мин, 12 100 g), надосадочную жидкость использовали для анализа. Анализ проводили на хроматографической системе Agilent 1200 («Agilent Technologies», Германия), колонке Symmetry C18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) с предколонкой Symmetry C18 (5 мкм, 3,9 × 20 мм) («Waters», США) в следующих условиях: скорость потока – 1 мл/мин, температура колонки – 50 °С, детекция при длине волны – 240 нм.

Мобильная фаза: для стенонов – MeCN : iPr-OH : H<sub>2</sub>O (50 : 45 : 5; v/v); для андростендиона/прогестерона – MeCN : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH (60 : 40 : 0,01; v/v). Калибровку проводили методом внешнего стандарта, основанным на сравнении площадей пиков. Результаты обрабатывали с помощью программы ChemStation Rev. В. 04.03 («Agilent Technologies»).

**Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР** регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия) на частоте 400 МГц. Химические сдвиги измеряли относительно сигналов тетраметилсилана. Приведены только характеристические <sup>1</sup>H-ЯМР-сигналы стероидов.

**Статистическая обработка данных.** Все измерения проводились не менее чем в 3 пов-

торностях; для каждой выборки вычислялись значения стандартного отклонения и доверительный интервал для нормального распределения при уровне значимости 0,95.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Биоконверсия стероидных 3β-спиртов бесклеточной культуральной жидкостью *N. simplex*.** Полученная при фильтрации супернатанта через бактериальный фильтр культуральная жидкость *N. simplex*, не содержащая клетки, осуществляла биоконверсию таких 3β-спиртов, как холестерин, фитостерин и дегидроэпиандростерон с образованием 3-кето-4-ен-продуктов: холестерона, фистостенонов и андростендиона соответственно (рис. 3, а). При этом было выявлено, что холестериноксидазная активность в культуральной жидкости присутствует вне зависимости от наличия стероидного индуктора.

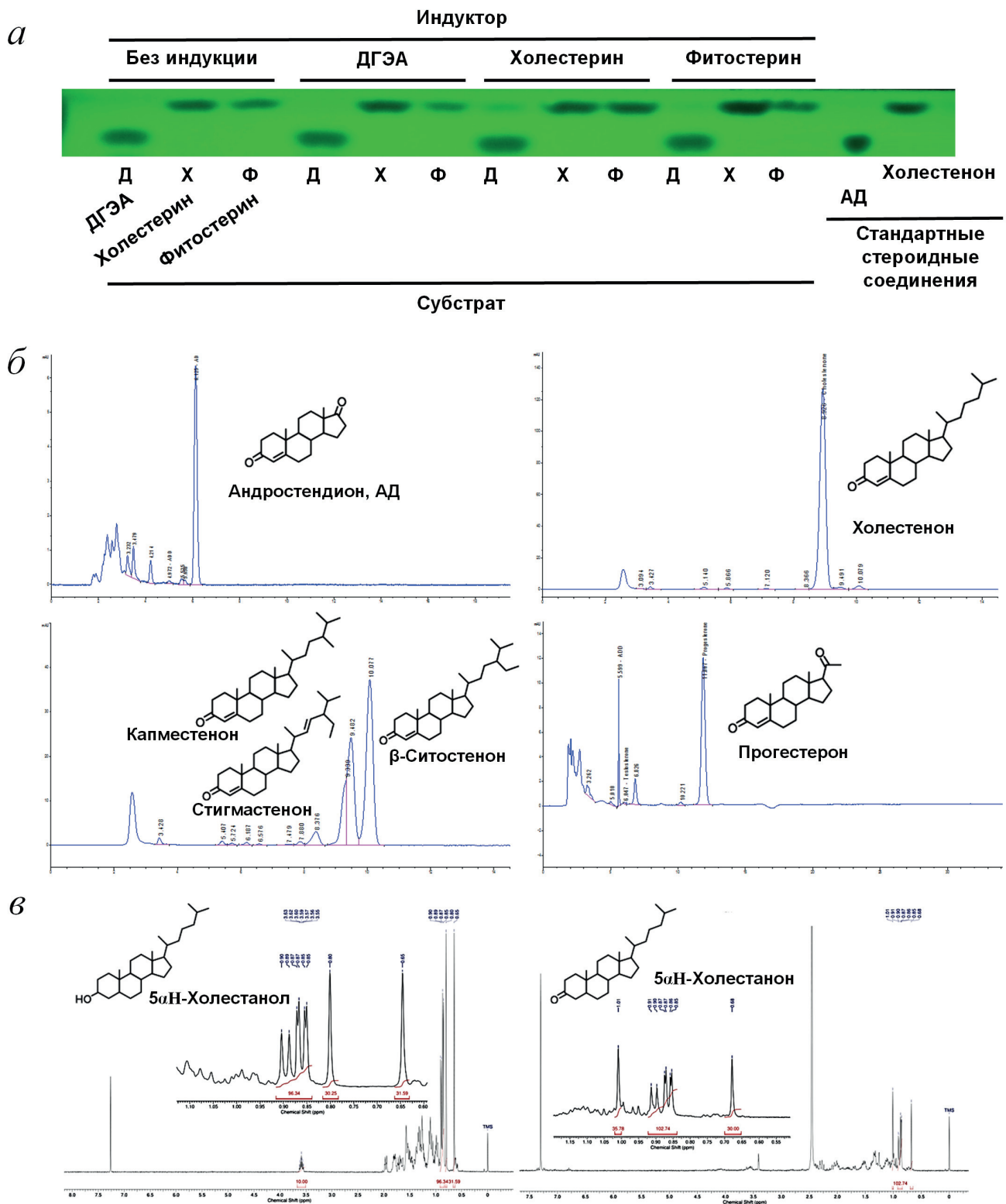
На основании данных ВЭЖХ и ТСХ-анализа было выявлено (рис. 3, б и в), что предпочтительными субстратами внеклеточной *ХО N. simplex* являлись холестерин и 5αН-холестанол, для которых за минимальное время инкубирования достигалась максимальная полнота конверсии; более низкую активность *ХО* наблюдали по отношению к стероидам с более короткой боковой цепью при C17, либо не содержащим алифатическую цепь.

**Анализ белковой последовательности *ХО N. simplex*.** Анализ аминокислотной последовательности *ХО N. simplex* (KR76\_09550) позволил выявить высокое сходство с *ХО Rhodococcus equi* (ChoE) (63,2%), *Rhodococcus erythropolis* (ChoE) (59,8%) и *Dietzia cinnamea* P4 (ChoE) (54,7%); умеренное сходство – с *ХО Streptomyces* (47–48%); низкое – с *ХО* микобактерий: *Mycobacterium leprae* (ChoD), *M. tuberculosis* H37Rv (ChoD), *Mycobacterium marinum* (ChoD) (15–23%) (рис. 4). Ближайшим гомологом *ХО N. simplex* (KR76\_09550) является содержащая сигнальный пептид внеклеточная *ХО R. equi* (ChoE) [9, 21, 22], в свою очередь, на 56% идентичная *ХО* представителей рода *Streptomyces* (рис. 4).

Анализ белковой последовательности *ХО N. simplex*, осуществлённый с использованием сервиса SignalP 6.0 [16], позволил предсказать наличие в *ХО N. simplex* (KR76\_09550) 41-аминокислотного *N*-терминального сигнального пептида (с вероятностью 0,9), который отщепляется в процессе секреции фермента Tat-зависимой системой белкового транспорта (с вероятностью 0,97).

Таким образом, исходя из полученных экспериментальных и биоинформатических дан-





**Рис. 3.** Анализ стероидных соединений. *а* – ТСХ-Профиль 3-кето-4-ен-продуктов биоконверсии различных 3 $\beta$ -спиринов: дегидроэпиандростерона (ДГЭА), холестерина и фитостерина культуральной жидкостью *N. simplex*, не содержащей клетки, в условиях выращивания без внесения стероидных индукторов и с индукцией дегидроэпиандростероном (ДГЭА), холестерином (Х) и фитостерином (Ф). Стандартные стероидные соединения: аутентичный андростендион (АД); аутентичный холестерин. *б* – ВЭЖХ-Профили продуктов с 3-кето-4-ен-структурой, образующихся при конверсии стероидных 3 $\beta$ -спиринов: дегидроэпиандростерона, холестерина, фитостерина и прегненолона с участием ХО *N. simplex*. *в* – Спектры <sup>1</sup>НЯМР 5 $\alpha$ Н-холестанола и 5 $\alpha$ Н-холестанона

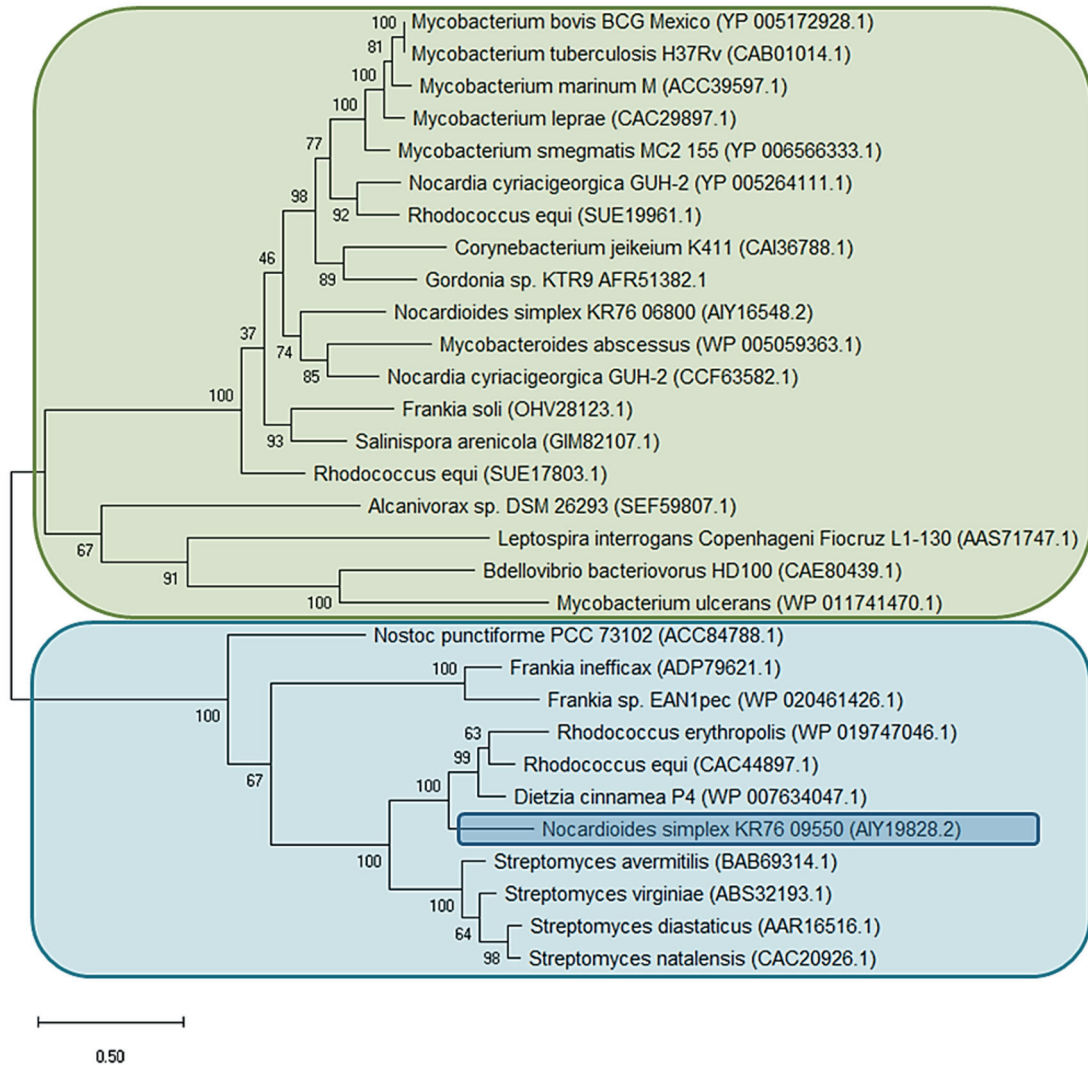


Рис. 4. Филогенетическая дендрогрaмма, иллюстрирующая положение ХО KR76\_09550 актинобактерии *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д относительно некоторых бактериальных ХО

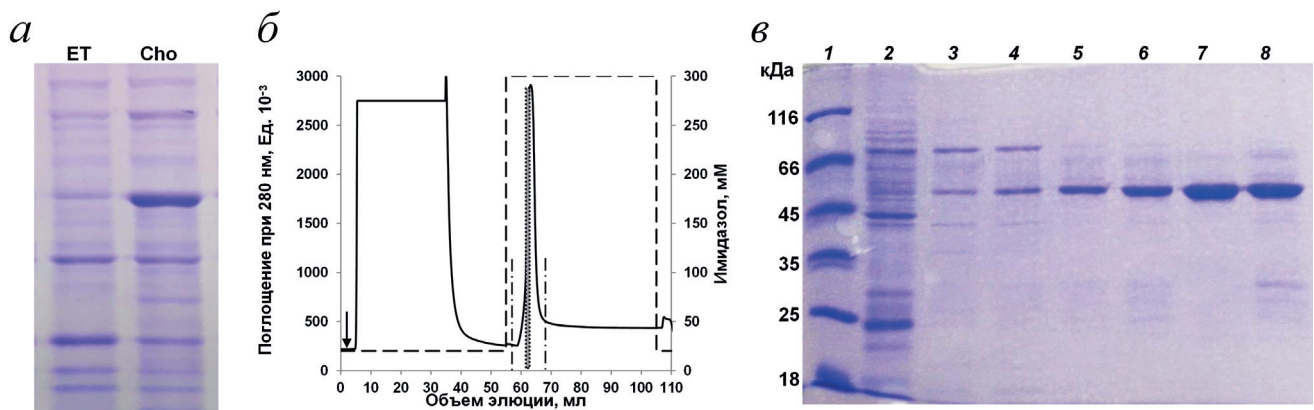


Рис. 5. Выделение и очистка рекомбинантной ХО<sub>NS</sub>. *a* – 10% Ds-Na-ПААГ-анализ клеточных лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21 (DE3), содержащих вектор pET28a (ET) и плазмиду pETCho (Cho). Индукция ИПТГ при 25 °С в течение 6 ч. Указана молекулярная масса для зрелой формы ХО, маркированной 6xHis. *б* – Профиль элюции ХО<sub>NS</sub> при аффинной хроматографии. Заштрихована область активного пика, отобранная для исследований. Сплошная линия – оптическое поглощение при 280 нм; штриховая линия – концентрация имидазола; штрих-пунктирная линия – границы активного пика; стрелкой показано нанесение препарата ХО<sub>NS</sub>. *в* – Денатурирующий электрофорез препаратов, полученных при выделении и очистке ХО<sub>NS</sub>. Дорожки: 1 – маркеры; 2 – гомогенат; 3 – дебрис; 4 – бесклеточный экстракт; 5 – элюат при нанесении пробы на колонку; 6 – элюат при промывке связывающим буфером; 7 – часть активного пика, отобранная для работы; 8 – плечи активного пика

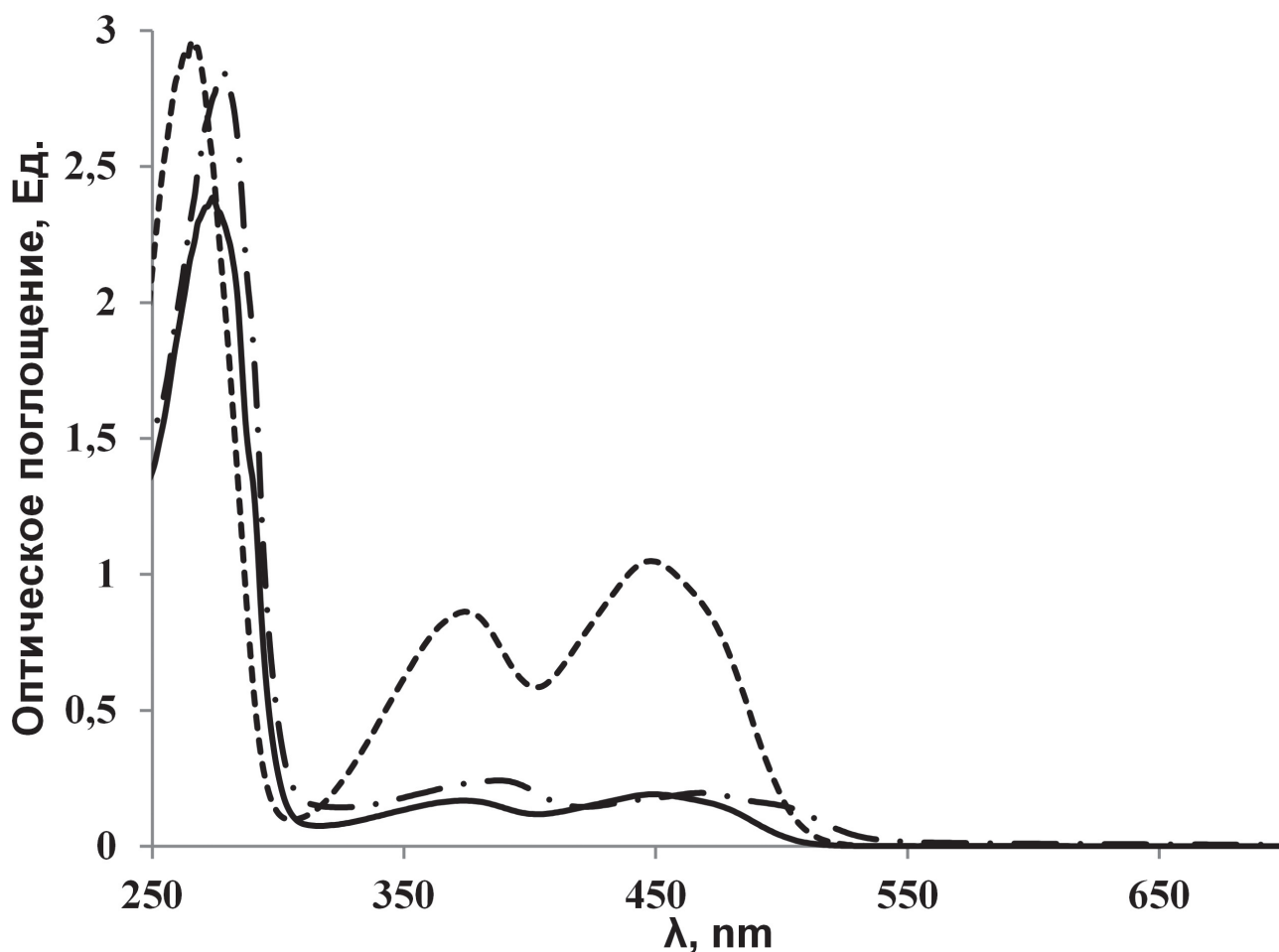


Рис. 6. Спектры оптического поглощения  $XO_{Ns}$ . Штриховая линия – FAD; штрих-пунктирная линия –  $XO_{Ns}$ ; сплошная линия –  $XO_{Ns}$ , обработанная 0,5%-ным Ds-Na

ных, нами сделан вывод о том, что  $XO$  *N. simplex* функционирует в виде внеклеточной зрелой формы, представляющей собой белковый продукт гена *cho* без сигнальной лидерной последовательности, удаляемой в процессе белковой секреции.

**Выделение и очистка  $XO_{Ns}$ .** Трансформированные плазмидой pETcho клетки *E. coli* BL21(DE3) продуцировали маркированную 6xHis-меткой зрелую форму  $XO$  *N. simplex* (55,6 кДа) без сигнального пептида (рис. 5, а). Применённый подход обеспечил высокий выход фермента на уровне гомогената (рис. 5, б и в).

Методом аффинной хроматографии был получен препарат  $XO_{Ns}$  с концентрацией ~5 мг белка в 1 мл, относящийся к центральной части активного пика (рис. 5, б). Ds-Na-ПААГ-Электрофореграмма полученных фракций представлена на рис. 5, в. Выход белка  $XO_{Ns}$  составил  $4 \pm 0,4\%$ .

**Спектральные и кинетические свойства  $XO_{Ns}$ .** Фермент  $XO_{Ns}$  имел максимумы поглощения при 385 и 470 нм, характерные для белков,

связанных с FAD (рис. 6). Обработка  $XO_{Ns}$  Ds-Na сдвигала максимумы поглощения к 370 и 450 нм, что характерно для растворённого FAD (рис. 6).

Мы использовали в качестве фермента сравнения препарат коммерческой  $XO_{Sh}$ , поскольку известно, что  $XO$  видов *Streptomyces* обладают высокой активностью и стабильностью [6, 23].

Результаты измерения активности  $XO_{Ns}$  в сравнении с коммерческой  $XO_{Sh}$  представлены на рис. 7, а–г. Как следует из рис. 7, а и б, ферменты  $XO_{Ns}$  и  $XO_{Sh}$  демонстрировали сходные зависимости от концентрации холестерина. На основании полученных результатов в дальнейших экспериментах использовали концентрацию стероидного субстрата, равную 0,5 мМ.

Анализ кинетических характеристик  $XO_{Ns}$  в отношении различных стероидов позволил заключить, что предпочтительным субстратом рекомбинантной  $XO$  *N. simplex* является холестерин по сравнению с фитостерином или прегненолоном, которые отличаются конфигурацией и длиной боковой цепи. Примеча-

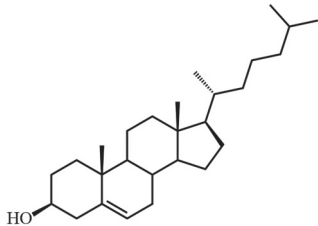
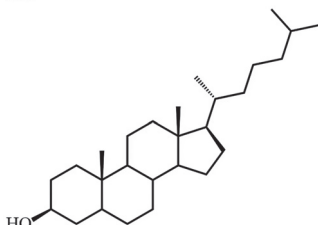
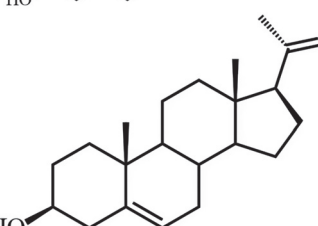
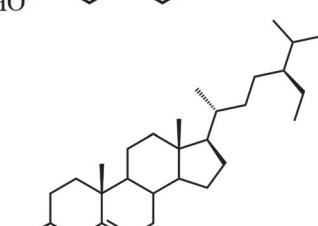
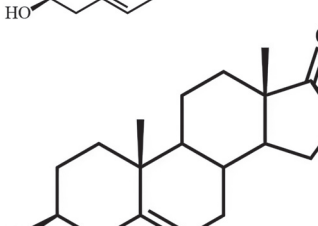


**Таблица 1.** Кинетические характеристики: константа Михаэлиса ( $K_M$ ), каталитическая константа ( $k_{cat}$ ) и каталитическая эффективность ( $k_{cat}/K_M$ )  $XO_{Ns}$ , а также коммерческой  $XO_{Sh}$  в отношении некоторых стероидных  $3\beta$ -спиртов

Субстрат	Фермент	$K_M$ , мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ (с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup> )
Холестерин	$XO_{Sh}$	310 ± 1	42,8 ± 0,02	138,53 ± 0,02
Холестерин	$XO_{Ns}$	610 ± 5	40,1 ± 0,31	65,74 ± 0,32
5 $\alpha$ Н-Холестанол	$XO_{Ns}$	590 ± 11	23,9 ± 0,04	40,50 ± 0,04
Прегненолон	$XO_{Ns}$	1030 ± 10	20,9 ± 0,05	20,23 ± 0,06
Фитостерин	$XO_{Ns}$	1080 ± 7	21,0 ± 0,13	19,47 ± 0,13

Примечание. Концентрация субстрата 0,5 мМ, рН 7,0, температура 30 °С.

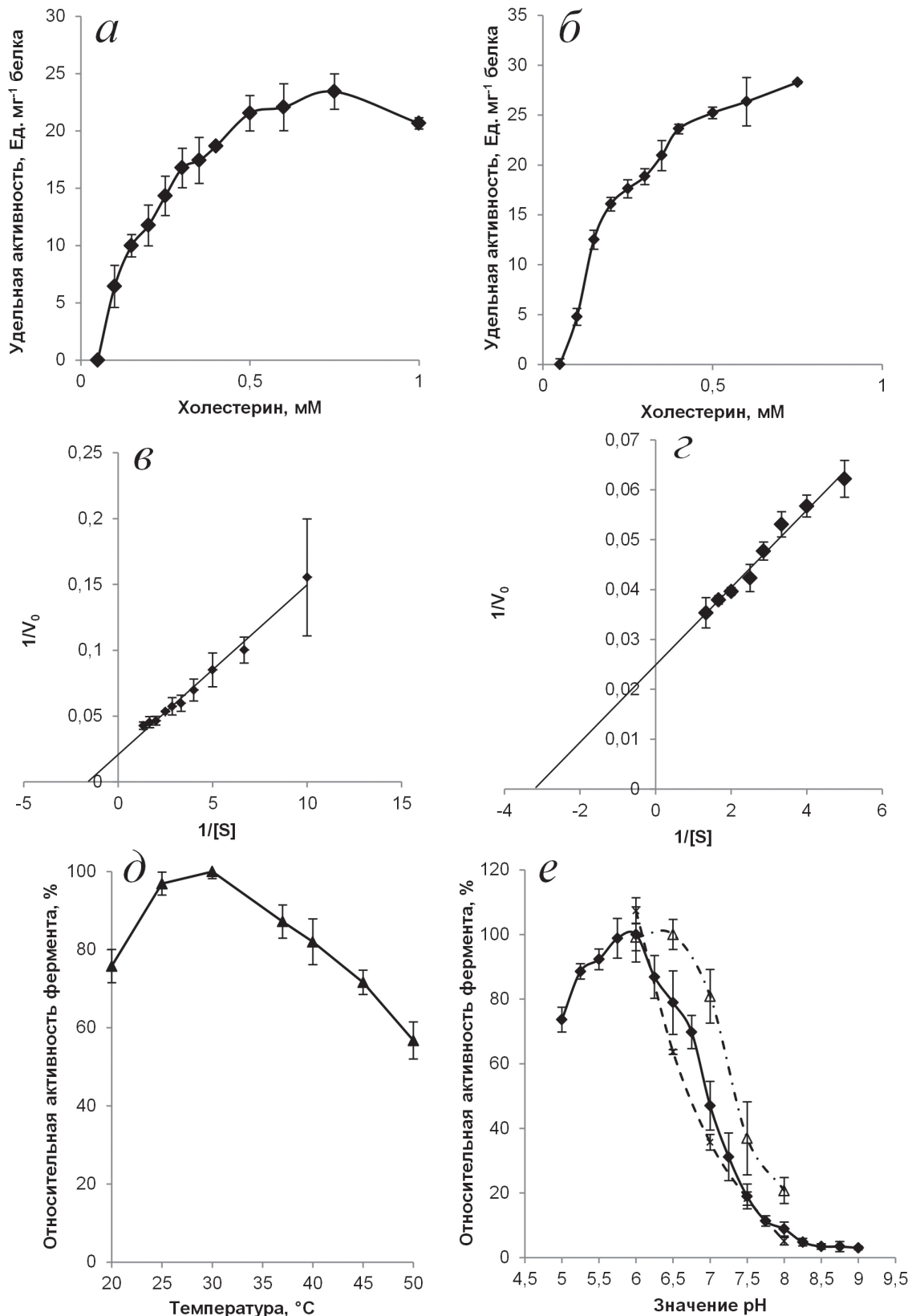
**Таблица 2.** Активность  $XO_{Ns}$  в отношении стероидов с различной конфигурацией боковой цепи

Субстрат	Химическая структура	Активность $XO_{Ns}$ , Ед. на 1 мг белка	Эффективность био- конверсии, мол. % (за 1 ч биоконверсии)
Холестерин		22 ± 2	84 ± 7
5 $\alpha$ Н-Холестанол		13 ± 2	н.о.
Прегненолон		9 ± 2	1 ± 0,3
Фитостерин ( $\beta$ -Ситостерин)		8 ± 1	20 ± 3
Дегидроэпиандростерон		2 ± 0,1	1 ± 0,1

Примечание. Концентрация субстрата 0,5 мМ, рН 7,0, температура 30 °С.

мол. % – мольная доля выхода вещества, выраженная в процентах.

н/о – не определена.



**Рис. 7.** Зависимость удельной активности  $XO_{Ns}$  от концентрации холестерина (*a*) в сравнении с удельной активностью коммерческой  $XO_{Sh}$  (*б*). Линеаризация в координатах Лайнуивера–Берка для  $XO_{Ns}$  (*в*) и коммерческой  $XO_{Sh}$  (*г*). Зависимость активности  $XO_{Ns}$  от температуры (*д*). Зависимость активности  $XO_{Ns}$  от величины pH среды в сравнении с активностью коммерческой  $XO_{Sh}$  (субстрат – 0,5 мМ холестерин) по данным спектрофотометрических измерений (*е*). Сплошная линия – активность  $XO_{Ns}$  в буфере Бриттона–Робинсона; штриховая линия – активность  $XO_{Ns}$  в Na-фосфатном буфере; штрих-пунктирная линия – активность коммерческой  $XO_{Sh}$  в Na-фосфатном буфере. За 100% принята максимальная активность (для  $XO_{Ns}$  зарегистрирована при pH 6,0, для коммерческой – при pH 6,5)

тельно, что наличие насыщенной 5(6)-двойной связи в 5 $\alpha$ H-холестаноле оказывало меньшее влияние на активность, чем наличие, длина и конфигурация боковой цепи при C17 стероидного субстрата (табл. 1, 2).

Результаты спектрофотометрического определения активности и эффективности биоконверсии представлены в табл. 2. Фермент  $\text{ХО}_{Ns}$  производил в 4 раза больше холестерина за 1 час биоконверсии по сравнению с коммерческим ферментом  $\text{ХО}_{Sh}$  ( $84 \pm 7$  мол. % против  $20 \pm 3$  мол. %).

Анализ температурного оптимума показал, что активность  $\text{ХО}_{Ns}$  сохраняется в диапазоне 20–50 °C с максимумом при 30 °C (рис. 7, д). Фермент  $\text{ХО}_{Sh}$  имел аналогичную температурную зависимость. Как  $\text{ХО}_{Ns}$ , так и  $\text{ХО}_{Sh}$  были активны в диапазоне pH 5–8, но слегка различались по оптимуму pH, который составлял 6,0 для  $\text{ХО}_{Ns}$  и 6,5 – для  $\text{ХО}_{Sh}$  (рис. 7, е).

Данные по стабильности при хранении для  $\text{ХО}_{Ns}$  представлены на рис. 8. Фермент сохранял 10 и 50% активности при хранении более месяца при 25 и 4 °C соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биотехнологически значимый штамм *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д эффективно проводит 1(2)-дегидрирование 3-кето-стероидов [8, 11] и способен окислять холестерин с образованием холестерина [24, 25]. В настоящем исследовании продемонстрирован высокий уровень активности внеклеточной ХО этого штамма в отношении различных 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен-стероидов. Фермент ХО как индуцированных, так и неиндуцированных клеток *N. simplex* катализировал модификацию 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен-фрагмента в 3-кето-4-ен-структуру. Эти результаты согласуются с известными данными о повышении экспрессии гена *cho* в присутствии стероидов [12] и указывают на высокий базальный уровень ХО в *N. simplex*. Индуцибельный характер бактериальных ХО был отмечен для используемых в качестве продуцентов ХО штаммов *Rhodococcus* и *Streptomyces* [2, 9, 21, 26, 27], в то время как высокая конститутивная активность ХО указывалась для мутантов *N. simplex* [28].

Интересно, что у стрептомицетов, не относящихся к стерин-катаболизирующим организмам, ген, кодирующий ХО, находится в центре кластера генов, кодирующих ферменты биосинтеза полиеновых антибиотиков, и регулируется транскрипционным активатором PimR (в случае *Streptomyces natalensis*) [8]. В геноме *N. simplex* не обнаружено ортологов гена, коди-

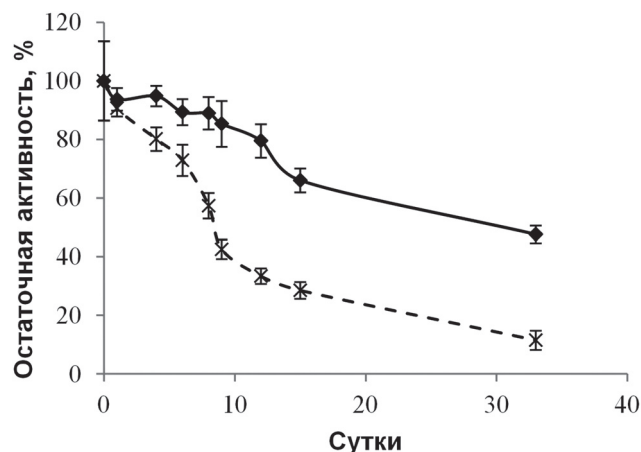


Рис. 8. Стабильность препаратов  $\text{ХО}_{Ns}$  при хранении в Na-фосфатном буфере (pH 7,0). Сплошная линия – при температуре 4 °C; штриховая линия – при 25 °C

рующего PimR (aj585085). У микобактерий деградация холестерина регулируется транскрипционными репрессорами TetR-типа: KstR и KstR2. В геноме *N. simplex* ген *KR76\_09550*, кодирующий ХО, находится вне кластеров катаболизма стероидов, но имеет предполагаемый сайт связывания KstR и, таким образом, может регулироваться KstR-фактором. Другие регуляторы катаболизма стероидов у актинобактерий в настоящее время не известны [8, 12, 29].

Белок ХО *N. simplex* проявляет наибольшее сходство с ХО из *R. equi* (ChoE) [9] и находится в той же филогенетической кладе, что и ХО *Streptomyces*, биохимические свойства и структура которых хорошо изучены [27]. Меньшее сходство ХО *N. simplex* наблюдалось с микобактериальными ХО из *M. leprae*, *M. tuberculosis* H37Rv и *M. marinum*. О другом ферменте *N. simplex* – *KR76\_06800* (AIY 16548.2, ChoD) – сообщалось, что он не обладает активностью ХО, но катализирует превращение холестерина в холестерин как дегидрогеназа в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола и феназинметосульфата [30].

В настоящей работе последовательность *KR76\_09550*, кодирующая зрелую форму ХО *N. simplex*, была клонирована в клетках *E. coli*; бхHis-меченый рекомбинантный фермент  $\text{ХО}_{Ns}$  был выделен и очищен. Насколько нам известно, это первое сообщение о рекомбинантной ХО из *N. simplex* Ас-2033Д. Опубликована только одна работа, в которой сообщалось о генно-инженерной ХО из *N. simplex* и указывалось, что изучалась зрелая форма ХО, укороченная на 10 и 5 аминокислотных остатков с N- и C-концов фермента соответственно [31]. С помощью аффинной хроматографии нами получен электрофоретически гомогенный препарат зрелой формы ХО *N. simplex* (55,6 кДа),



меченный б<sup>3</sup>His-фрагментом. Концентрация белка в очищенном препарате  $\text{ХО}_{Ns}$  составляла ~3,7 мг в 1 мл, что соответствует  $4 \pm 0,4\%$  от исходного количества белка.

Являясь мономерными белками, бактериальные ХО содержат в качестве простетической группы одну молекулу FAD. Белок  $\text{ХО}_{Ns}$  в окисленном состоянии имел максимумы поглощения при 385 и 470 нм, которые практически совпали с максимумами поглощения для  $\text{ХО}_{Sh}$  [32]. Сравнительный анализ спектральных свойств  $\text{ХО}_{Ns}$  и  $\text{ХО}_{Sh}$  позволил предположить, что в  $\text{ХО}_{Ns}$  флаavin находится в анионной форме как в восстановленном, так и в переходном состояниях. Природа связывания FAD у  $\text{ХО}_{Ns}$  и  $\text{ХО}_{Sh}$  аналогична и определяется как нековалентное связывание. Известно, что высвобождение нековалентно связанного кофактора возможно, например, при нагревании белка до 90 °C [32].

Особенностью флавиновых белков, способствующей правильному связыванию кофактора, является наличие консенсусной последовательности, состоящей из повторяющихся остатков глицина (GXGXXG) и остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты, отстоящих друг от друга примерно на 20 аминокислотных остатков [32]. В случае нековалентной формы  $\text{ХО}_{Sh}$  — это последовательность остатков глицина (G17-X-G19-X-G21-G/A22), за которыми следует E40, что предполагает нуклеотид-связывающую укладку белка; в случае ковалентно связанной формы ХО этот консенсус отсутствует, что указывает на вероятное отсутствие у этой формы фермента нуклеотид-связывающей складки [32]. В структуре белка ХО *N. simplex* мы обнаружили последовательность G15-X-G17-X-G19-G20, за которой следовал E38, что укладывается в теорию строения нековалентно связанной формы флавина у этой ХО.

Кинетические характеристики  $\text{ХО}_{Ns}$  были сходны или незначительно отличались от таковых для  $\text{ХО}_{Sh}$  по максимальной скорости реакции  $V_{\max}$  и величине каталитической константы  $k_{\text{cat}}$  по отношению к холестерину (табл. 1). Однако  $K_M$  для  $\text{ХО}_{Ns}$  была в два раза выше, чем  $K_M$  для  $\text{ХО}_{Sh}$  и, соответственно, каталитическая эффективность ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) для  $\text{ХО}_{Ns}$  была в 2 раза ниже, чем у  $\text{ХО}_{Sh}$ . Измерения активности двух ферментов при высоких концентрациях субстрата ( $\geq 1$  мМ) показали возможное ингибирование субстратом. Помимо холестерина, фермент  $\text{ХО}_{Ns}$  проявлял активность в отношении 5 $\alpha$ H-холестанола, фитостерина, прегненолона и дегидроэпиандростерона, причём уровень активности зависел от структуры и длины алифатической боковой цепи в положении C17, будучи самым высоким для холе-

стерина и уменьшаясь в порядке холестерин > 5 $\alpha$ H-холестанол > прегненолон > фитостерин > дегидроэпиандростерон (табл. 2). Результаты, полученные для  $\text{ХО}_{Ns}$ , соответствуют результатам, полученным для фильтрата культуральной жидкости *N. simplex*, и характерны для ХО других бактерий [9, 33]. Примечательно, что самая низкая скорость образования 3-кето-4-ен-стероидов наблюдалась при использовании дегидроэпиандростерона и прегненолона.

Образование 3-кето-4-ен-стероидов из соответствующих 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен-субстратов является подтверждением двойственной функции  $\text{ХО}_{Ns}$ , обеспечивающей как дегидрирование 3 $\beta$ -гидроксильной группы, так и изомеризацию двойной связи из положения C5(6) в C4(5). Фермент также окислял субстрат 5 $\alpha$ H-холестанол с насыщенной связью C5(6), но с вдвое меньшей активностью.

Скорость окисления АБТС пероксидазой хрена в сопряжённой реакции с  $\text{ХО}_{Ns}$  зависела от pH и была максимальной в диапазоне pH 5,75–6,25 (рис. 7, e). Аналогичные результаты были получены в Na-фосфатном буфере и буфере Бриттона–Робинсона. Такой слабнокислый оптимум pH не характерен для бактериальных ХО, но подтверждён в наших экспериментах и для  $\text{ХО}_{Sh}$  (рис. 7, e). Данные отличаются от результатов, полученных для генно-инженерной ХО из *Pimelobacter simplex* [31], однако согласуются с данными, описанными для внеклеточных и некоторых внутриклеточных ХО из актинобактерий, относящихся к семейству Nocardiaceae [34]. Фермент  $\text{ХО}_{Ns}$  продемонстрировал высокую стабильность при хранении, что важно для его возможного практического применения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе получен электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантной ХО *N. simplex* (55,6 кДа). Фермент ХО *N. simplex* относится к оксидазам глюкозо-метанол-холинового семейства и содержит нековалентно связанный кофактор FAD. Сходство ХО *N. simplex* по аминокислотным остаткам с ХО из *R. equi* (ChoE) составляет 63,2%. Показатели рекомбинантного фермента  $\text{ХО}_{Ns}$  из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д сопоставимы с таковыми для коммерческого препарата ХО штамма *Streptomyces* даже в неоптимизированных условиях.

Полученные результаты расширяют знания о разнообразии бактериальных ХО и указывают на биотехнологический потенциал внеклеточной ХО из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д.

**Вклад авторов.** В.В. Фокина, М.В. Карпов, В.В. Коллеров – концепция и проведение экспериментов; Д.О. Эпиктетов, А.В. Свиридов – проведение экспериментов; Е.Ю. Брагин – биоинформатический анализ; А.В. Казанцев – МС-и ЯМР-анализ; А.А. Шутов – ВЭЖХ-анализ; В.В. Фокина, М.В. Карпов, В.В. Коллеров, А.В. Свиридов – обсуждение результатов исследования и написание текста; М.В. Донова – руководство работой и редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kreit, J. (2017) Microbial catabolism of sterols: focus on the enzymes that transform the sterol 3 $\beta$ -hydroxy-5-en into 3-keto-4-en, *FEMS Microbiol. Lett.*, **364**, fnx007, doi: 10.1093/femsle/fnx007.
- Lario, P. I., Sampson, N., and Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: What atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity, *J. Mol. Biol.*, **326**, 1635-1650, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00054-8.
- Salè, F. O., Marchesini, S., Fishman, P. H., and Berra, B. (1984) A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts, *Anal. Biochem.*, **142**, 347-350, doi: 10.1016/0003-2697(84)90475-5.
- Doukyu, N. (2009) Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 825-837, doi: 10.1007/s00253-009-2059-8.
- Heath, R. S., Sangster, J. J., and Turner, N. J. (2022) An engineered cholesterol oxidase catalyses enantioselective oxidation of non-steroidal secondary alcohols, *Chembiochem.*, **23**, e202200075, doi: 10.1002/cbic.202200075.
- Corbin, D. R., Greenplate, J. T., Wong, E. Y., Purcell, J. P. (1994) Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4239-4244, doi: 10.1128/aem.60.12.4239-4244.1994.
- El-Naggar, N. El.-A., Soliman, H. M., and El-Shweihy, N. M. (2018) Extracellular cholesterol oxidase production by *Streptomyces aegyptia*, *in vitro* anticancer activities against rhabdomyosarcoma, breast cancer cell-lines and *in vivo* apoptosis, *Sci. Rep.*, **8**, 2706, doi: 10.1038/s41598-018-20786-3.
- Kreit, J., and Sampson, N. S. (2009) Cholesterol oxidase: physiological functions, *FEBS J.*, **276**, 6844-6856, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07378.x.
- Navas, J., González-Zorn, B., Ladrón, N., Garrido, P., and Vázquez-Boland, J. A. (2001) Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*, *J. Bacteriol.*, **183**, 4796-4805, doi: 10.1128/JB.183.16.4796-4805.2001.
- García, J. L., Uhía, I., and Galán, B. (2012) Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria, *Microb. Biotechnol.*, **5**, 679-699, doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00331.x.
- Fokina, V. V., Sukhodol'skaya, G. V., Gulevskaya, S. A., Gavrish, E. Y., Evtushenko, L. I., et al. (2003) The 1(2)-dehydrogenation of steroid substrates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D, *Mikrobiologiya*, **72**, 24-29, doi: 10.1023/A:1022265720470.
- Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Fokina, V. V., Bragin, E. Y., Lobastova, T. G., et al. (2020) Genome-wide transcriptome profiling provides insight on cholesterol and lithocholate degradation mechanisms in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D, *Genes*, **11**, 1229, doi: 10.3390/genes11101229.
- Текучева Д. Н., Фокина В. В., Николаева В. М., Шутов А. А., Карпов М. В., и др. (2022) Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон штаммами *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ac-1815Д и *Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д, *Микробиология*, **91**, 353-363, doi: 10.31857/S0026365622300097.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300, doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731-2739, doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., et al. (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models, *Nat. Biotechnol.*, **03**, doi: 10.1038/s41587-021-01156-3.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
- Britton, H. T. K., Robinson, R. A. (1931) CXCVIII. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, 1456-1462, doi: 10.1039/JR9310001456.
- Alshawafi, W. M., Aldahri, M., Almulaiky, Y. Q., Salah, N., Moselhy, S. S. et al. (2018) Immobilization of horseradish peroxidase on nonwoven polyester fabric coated with chitosan. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46** (sup3), S973-S981, doi: 10.1080/21691401.2018.1522321.

21. Ladrón, N., Fernández, M., Agüero, J., González Zörn, B., Vázquez-Boland, J. A., et al. (2003) Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3241-3245, doi: 10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003.
22. Kämpfer, P., Dott, W., Martin, K., and Glaeser, S. P. (2014) *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 755-761, doi: 10.1099/ijs.0.053322-0.
23. Lolekha, P. H., Srisawasdi, P., Jearanaikoon, P., Wetprasit, N., Sriwanthana, B., et al. (2004) Performance of four sources of cholesterol oxidase for serum cholesterol determination by the enzymatic endpoint method, *Clin. Chim. Acta*, **339**, 135-145, doi: 10.1016/j.cccn.2003.10.005.
24. Fokina, V. V., Sukhodolskaya, G. V., Baskunov, B. P., Turchin, K. F., Grinenko, G. S., et al. (2003) Microbial conversion of pregna-4,9(11)-diene-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dione acetates by *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D, *Steroids*, **68**, 415-421. doi: 10.1016/S00039-128X(03)00043-6.
25. Sukhodolskaya, G., Fokina, V., Shutov, A., Nikolayeva, V., Savinova, T., et al. (2017) Bioconversion of 6-(*N*-methyl-*N*-phenyl) aminomethyl androstane steroids by *Nocardioideis simplex*, *Steroids*, **118**, 9-16, doi: 10.1016/j.steroids.2016.11.001.
26. Gadda, G., Wels, G., Pollegioni, L., Zucchelli, S., Ambrosius, D., et al. (1997) Characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*, *Eur. J. Biochem.*, **250**, 369-376, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.0369a.x.
27. Yue, Q. K., Kass, I. J., Sampson, N. S., and Vrielink, A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants, *Biochemistry*, **38**, 4277-4286, doi: 10.1021/bi982497j.
28. Jeong, J. M., and Young-Sun, J. (2008) A simple and rapid method for screening of *Nocardioideis simplex* mutant with high cholesterol oxidase activity, *Appl. Biol. Chem.*, **51**, 338-341 doi: 10.3839/jksabc.2008.058
29. Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Fokina, V. V., Pekov, Y. A., Ivashina, T., et al. (2017) Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D, *Curr. Genet.*, **62**, 643-656, doi:10.1007/s00294-016-0568-4.
30. Qin, H. M., Wang, J. W., Guo, Q., Li, S., Xu, P., et al. (2017) Refolding of a novel cholesterol oxidase from *Pimelobacter simplex* reveals dehydrogenation activity, *Protein Expr. Purif.*, **139**, 1-7, doi: 10.1016/j.pep.2017.07.008.
31. Qin, H. M., Zhu, Z., Ma, Z., Xu, P., Guo, Q., et al. (2017) Rational design of cholesterol oxidase for efficient bioresolution of cholestane skeleton substrates, *Sci. Rep.*, **7**, 16375, doi: 10.1038/s41598-017-16768-6.
32. Devi, S., and Kanwar, S. S. (2017) Cholesterol oxidase: source, properties and applications, *Insights Enzyme Res.*, **1**, 1, doi: 10.21767/2573-4466.100005.
33. Srisawasdi, P., Jearanaikoon, P., Kroll, M. H., and Lolekha, P. H. (2005) Performance characteristics of cholesterol oxidase for kinetic determination of total cholesterol, *J. Clin. Lab. Anal.*, **19**, 247-252, doi: 10.1002/jcla.20086.
34. Kumari, L., and Kanwar, S. S. (2012) Cholesterol oxidase and its applications, *Adv. Microbiol.*, **2**, 49-65, doi: 10.4236/aim.2012.22007.

## RECOMBINANT EXTRACELLULAR CHOLESTEROL OXIDASE FROM *Nocardioideis simplex*

V. V. Fokina<sup>1\*</sup>, M. V. Karpov<sup>1</sup>, V. V. Kollerov<sup>1</sup>, E. Y. Bragin<sup>1</sup>, D. O. Epiktetov<sup>1</sup>,  
A. V. Sviridov<sup>1</sup>, A. V. Kazantsev<sup>2</sup>, A. A. Shutov<sup>1</sup>, and M. V. Donova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences; Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: 2vyfokina@gmail.com

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Cholesterol oxidase is a highly demanded enzyme that is used in medicine, pharmacy, agriculture, chemistry, and biotechnology. The enzyme catalyzes oxidation of 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene to 3-keto-4-ene steroids with the formation of hydrogen peroxide. Extracellular cholesterol oxidase (ChO) of *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D was the focus of this study. A 6xHis-tagged mature form of *N. simplex* ChO (55.6 kDa) was expressed in an *Escherichia coli* host. The recombinant *N. simplex* ChO (ChO<sub>Ns</sub>) was isolated and purified using affinity chromatography. The enzyme proved functional towards cholesterol, cholestanol, phytosterol, pregnenolone, and dehydroepiandrosterone. Its activity depended on the structure and length of the aliphatic side chain at C17 of the steroid nucleus, being lower with pregnenolone and dehydroepiandrosterone. The enzyme was active in a pH range of 5.25÷6.5 with a pH optimum at 6.0. Kinetic assays and storage stability tests demonstrated that ChO<sub>Ns</sub> characteristics are generally comparable with or superior to those of commercial ChO from *Streptomyces hygroscopicus* (ChO<sub>St</sub>). The results contribute to the knowledge on microbial ChOs and evidence that ChO from *N. simplex* VKM Ac-2033D is promising for further applications.

**Keywords:** cholesterol, cholesterol oxidase, actinobacteria, recombinant enzyme



## СИГНАЛИЗАЦИЯ И ГЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА: ТЕКУЩИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ШИРОКОЗАХВАТНЫХ ПОДХОДОВ

### Обзор

© 2022 А.В. Воротников<sup>1,2\*</sup>, Д.В. Попов<sup>1,3\*</sup>, П.А. Махновский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия; электронная почта: a.vorotnikov@icloud.com, danil-popov@yandex.ru

<sup>2</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 121552 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.05.2022

После доработки 09.08.2022

Принята к публикации 10.08.2022

Скелетные мышцы вносят основной вклад в появление инсулинорезистентности и нарушение утилизации глюкозы из кровотока, развитие гипергликемии и диабета 2-го типа. Молекулярные механизмы регуляции захвата глюкозы мышечными клетками многообразны, включая инсулинозависимые как основные, но не единственные. Они задействуют большой спектр белков, которые контролируют внутриклеточный трафик и выход транспортеров глюкозы на поверхность клетки, формируя разветвленную регуляторную сеть. В обзоре подчеркивается преимущество широкозахватных подходов для поиска активируемых инсулином регуляторных белков и генов в скелетной мышце людей с разной степенью метаболических нарушений. Обсуждаются методические подходы для оценки метаболических нарушений и молекулярных ответов скелетной мышцы человека на инсулин. Анализируются известные молекулярные механизмы регуляции захвата глюкозы и первые результаты фосфопротеомных и транскриптомных исследований, раскрывших масштабную сеть мишеней инсулина в мышечных клетках. Эти результаты показывают, что формирование ясной картины тех изменений, которые происходят при развитии метаболических нарушений, требует системного и сочетанного анализа на разных уровнях регуляции, включая сигнальные системы, транскрипционные факторы и генную экспрессию. Такой анализ представляется перспективным для поиска неописанных ранее механизмов регуляции захвата глюкозы скелетной мышцей и выявления ключевых регуляторов, являющихся потенциальными мишенями новых терапевтических препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** скелетная мышца, инсулинорезистентность, инсулиновая сигнализация, АМПК, захват глюкозы, фосфопротеом, транскриптом, сахарный диабет 2 типа.

**DOI:** 10.31857/S032097252209007X, **EDN:** BAWWXU

### ВВЕДЕНИЕ

В большинстве развитых стран Европы от 15 до 25% взрослого населения страдает ожирением.

По прогнозам ВОЗ, к 2030 г. более 40% населения этих стран будет иметь избыточный вес. Ожирение служит основным фактором риска развития инсулинорезистентности (ИнсРез),

Принятые сокращения: ИнсРез – инсулинорезистентность; СД2Т – сахарный диабет 2-го типа; ТФ – транскрипционные факторы; Akt (АКТ – для белка человека) – киназа, кодируемая ретровирусным онкогеном из клеток линии АКТ-8, выведенной из Стока А линии к тимомы мышей AKR; АМПК – АМР-зависимая протеинкиназа; СаМК2 (САМК2 – для белка человека) – кальций/кальмодулин-зависимая киназа II-типа; СК1/2 – казеинкиназы I/II-типа; Glut4 (GLUT4 – для белка человека) – транспортер глюкозы 4-типа; GSV – везикулы хранения GLUT4; IFG – повышенный уровень глюкозы натощак; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; IGT – нарушенная глюкозотолерантность; IRS – субстрат рецептора инсулина; mTOR (MTOR – для белка человека) – механистическая мишень рапамицина; TBC1D1 и TBC1D4 (AS160) – белки, содержащие TBC-домен.

\* Адресат для корреспонденции.



ведущей к развитию гипергликемии и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т), нарушению функций кровеносных сосудов, почек и зрения, сердечно-сосудистым и онкологическим осложнениям [1, 2]. Это подчеркивает системный и взаимосвязанный характер метаболических нарушений, накладывая определенные ограничения на их изучение непосредственно у человека. ИнсРез проявляется как снижение способности тканей захватывать глюкозу из кровотока в ответ на инсулин. С точки зрения регуляции уровня глюкозы в плазме крови, основными мишенями инсулина выступают печень, жир и скелетные мышцы. В норме скелетные мышцы составляют 30–40% от массы тела. Даже в покое на них приходится до 80% инсулинозависимого захвата глюкозы [3]. Это свидетельствует об исключительной роли скелетных мышц в развитии метаболических нарушений и подчеркивает важность изучения молекулярных механизмов развития ИнсРез именно в этой ткани.

Изучение различий метаболических параметров в биоптатах скелетных мышц людей с разной выраженностью метаболических нарушений позволяет обнаружить наиболее яркие изменения экспрессии и/или активности ферментов и сигнальных белков. Животные модели, включая нокаутных и трансгенных животных, позволяют расширить экспериментальные возможности и сопоставить динамику молекулярных и патофизиологических изменений [4, 5]. Однако накапливается все больше данных о различиях метаболизма грызунов и человека. Кроме того, животные крайне устойчивы к развитию СД2Т. В частности, у грызунов срок жизни слишком короткий для достижения конечных стадий СД2Т. Поэтому результаты, полученные на животных моделях, следует с осторожностью переносить на человека [6]. Наконец, клеточные модели крайне полезны для изучения динамики внутриклеточных реакций, в том числе сигнальных на инсулин и другие стимулы [7, 8]. Они удобны для моделирования отдельных стадий патогенеза СД2Т (например, гиперлипидемии, гиперинсулинемии или гипергликемии) [9–11] и для выяснения эпигенетических изменений, происходящих при ожирении и СД2Т [12–15].

В последнее время стало ясно, что инсулин активирует в клетках большой набор сигнальных молекул, объединенных в единую сеть [7, 8]. Стал очевиден масштабный характер молекулярных изменений, сопровождающих появление и прогрессию ИнсРез и СД2Т [16, 17]. Для изучения многокомпонентных сигнальных клеточных систем все большую значимость приобретают широкозахватные методы. Они

позволяют одновременно регистрировать тысячи молекулярных событий, связанных с изменением содержания белков и метаболитов, их модификаций, генной экспрессии, эпигенома и метаболома. Комплексная биоинформатическая обработка таких «больших» данных позволяет предположить причинно-следственные связи и обозначить ключевые молекулярные механизмы и регуляторы, изменение функций которых может быть связано с развитием метаболических нарушений.

Данный обзор сфокусирован на результаты пока немногочисленных работ, в которых была предпринята попытка связать системные нарушения метаболизма с молекулярными изменениями в скелетных мышцах у человека и животных. Для этого сначала обсуждаются подходы для оценки системной ИнсРез и сравнительного анализа изменений, ассоциированных с развитием ИнсРез и СД2Т. Чтобы высветить их масштабный характер даже на конечном, молекулярном уровне, далее кратко рассмотрены внутриклеточные механизмы регуляции захвата глюкозы клетками. Наконец, обсуждаются имеющиеся результаты и перспективы широкозахватных методик для получения комплексной картины тех изменений, которые могут позволить выявить значимые терапевтические мишени.

## СПОСОБЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА

До сих пор нет четкой картины молекулярных изменений, в том числе в скелетной мышце, при развитии СД2Т. Это связано с тем, что они многочисленны и взаимосвязаны, но не происходят дискретно, а развиваются долго и неоднородно, в соответствии с индивидуальными особенностями человека. Изучение их динамики предполагает анализ биопсийного материала добровольцев, стратифицированных по степени развитости метаболических нарушений. Для этого, по данным обширных клинических наблюдений, были определены и общеприняты референсные показатели [18–20]. Ими служат уровень инсулина или глюкозы в плазме крови натощак (т.е. до начала глюкозотолерантного теста), уровень глюкозы в крови через 2 ч после начала глюкозотолерантного теста и уровень гликированного гемоглобина (A1C) в крови натощак. Стратификация пациентов происходит на основе этих показателей или их сочетаний (см. ниже).

Ожирение, связанное с накоплением преимущественно висцерального жира, является

основным фактором риска развития метаболических нарушений, ИнсРез и СД2Т [18]. Это состояние связано с хроническим чрезмерным потреблением пищи (так называемая «западная диета») и снижением энергозатрат из-за малоактивного образа жизни. На ранней фазе клинические проявления метаболических нарушений, как правило, отсутствуют [21, 22]. Прогрессирующее ожирение ведет к нарушению жирового обмена, развитию воспаления в жировой ткани и дисфункции адипоцитов [23, 24]. В том числе снижается секреция адипонектина, который увеличивает чувствительность клеток к инсулину, а секреция провоспалительных цитокинов и липолиз в жировой ткани усиливаются. В результате уровень свободных жирных кислот и липопротеидных триглицеридов в плазме крови повышается, приводя к накоплению эктопического жира в других тканях, в том числе в скелетных мышцах [21, 25, 26]. Считается, что эти факторы являются основными триггерами ИнсРез в скелетных мышцах [16, 27].

ИнсРез может развиваться в скрытой форме годами без видимых клинических проявлений. Это связано с тем, что повышенная секреция инсулина компенсирует ослабление клеточных реакций, поддерживая углеводный и жировой обмен на нужном уровне [22]. Первые признаки некомпенсированной ИнсРез проявляются как небольшое повышение уровня глюкозы в крови натощак от 5,6 до 7,8 мМ (IFG, impaired fasting glucose) и/или как системное нарушение толерантности к глюкозе (IGT, impaired glucose tolerance) [18–20] (рис. 1, а и б). Индивидуальное или сочетанное проявление этих параметров отражает гетерогенность патогенеза СД2Т и тоже может использоваться при стратификации пациентов [19]. IGT определяют с помощью глюкозотолерантного теста как повышенное содержание глюкозы (7,8–11 мМ) в крови через 2 ч после принятия раствора 75 г глюкозы натощак [18]. В состоянии предиабета уровень инсулина в крови натощак повышен лишь иногда, но он всегда выше в ответ на нагрузку глюкозой (рис. 1, а и в). Таким образом, IFG отражает наличие дефектов как инсулинозависимых, так и независимых механизмов поглощения глюкозы тканями натощак [28], тогда как IGT отражает нарушения захвата глюкозы тканями в ответ на стимуляцию эндогенным инсулином.

СД2Т характеризуется устойчивым повышением уровня глюкозы натощак (>7 мМ) и через 2 ч после начала глюкозотолерантного теста (>11 мМ) (рис. 1, а и б) [18]. На ранних стадиях СД2Т уровень инсулина в крови натощак

зачастую повышен (>9 мкМЕ/мл), но пиковая концентрация инсулина в крови не изменяется в процессе глюкозотолерантного теста и падает на поздних стадиях заболевания (рис. 1, в). Это связано с прогрессирующей дисфункцией панкреатических  $\beta$ -клеток и нарушением секреции инсулина. В результате инсулинозависимые ткани снижают захват глюкозы из крови после приема пищи, и развивается устойчивая гипергликемия. На этом этапе патология СД2Т становится практически необратимой, соединяя в себе основные черты диабета типов 1 и 2, и лечение становится симптоматическим.

Отсутствие клинически релевантных маркеров молекулярных изменений в скелетной мышце при ИнсРез и маркеров степени дисфункции  $\beta$ -клеток затрудняет определение стадий заболевания и стратификацию пациентов для получения биопсийного материала и интерпретации результатов его сравнительного анализа. Для решения этой проблемы используются референсные значения глюкозы и инсулина крови, полученные в глюкозотолерантном тесте (рис. 1, а). Они позволяют унифицировать группы сравнения испытуемых [18] и получать результаты на больших выборках [19, 20].

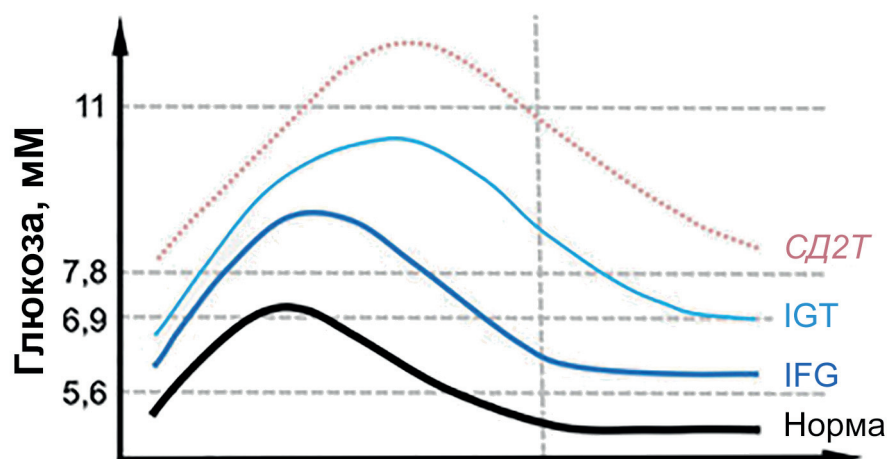
Глюкозотолерантный тест достаточно прост, и поэтому рутинно используется для определения показателей углеводного обмена (в т.ч. IFG и IGT). Он отражает исходное состояние (натощак) и системную реакцию организма (изменение уровня глюкозы в плазме крови) на прирост эндогенного инсулина. Поскольку последний сам по себе зависит от степени выраженности патологии, количественная оценка чувствительности к инсулину с помощью глюкозотолерантного теста невозможна. Важно отметить, что в этом тесте для всех людей используется стандартная доза глюкозы (75 г), что затрудняет сопоставление и интерпретацию результатов для людей, значительно различающихся по массе тела.

Для количественной оценки системной ИнсРез в качестве «золотого стандарта» используется гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест [29]. В кровь одновременно вводят инсулин и глюкозу, подбирая скорость подачи инсулина так, чтобы его уровень (100 мкМЕ/мл) был сопоставим с максимальным физиологическим уровнем при приеме пищи. При этом скорость введения глюкозы подбирается так, чтобы поддерживать ее уровень в крови постоянным. Через 2–3 ч удается достичь равновесия между скоростью введения и утилизации глюкозы тканями. Этот баланс поддерживается в течение 1–2 ч, и по количеству введенной (и утилизированной) за это

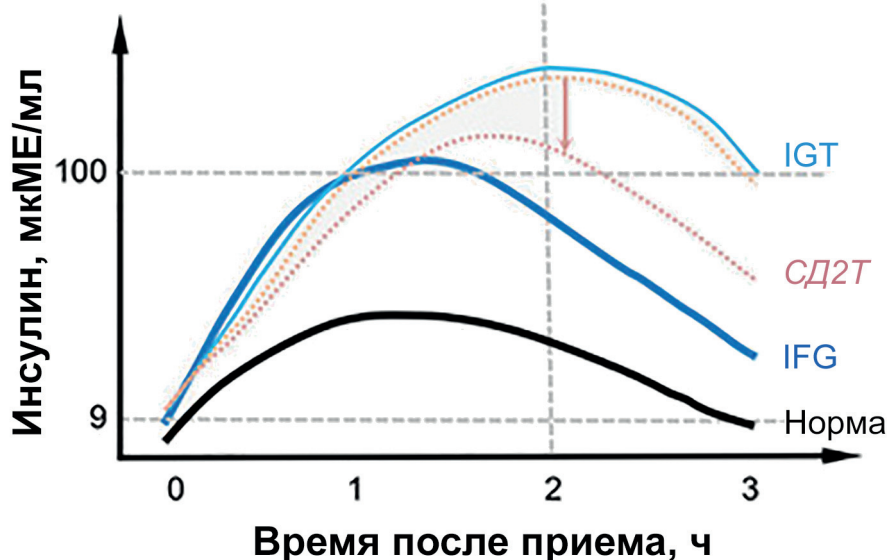
а

		Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	Глюкоза натощак, мМ	Глюкоза через 2 ч теста, мМ
Норма		18,5-24,9	<5,6	<7,8
Предиабет	IFG	≥25	<b>5,6-6,9</b>	<7,8
	IGT	≥25	5,6-6,9	<b>7,8-11</b>
СД2Т		>>25	<b>≥7</b>	<b>≥11</b>

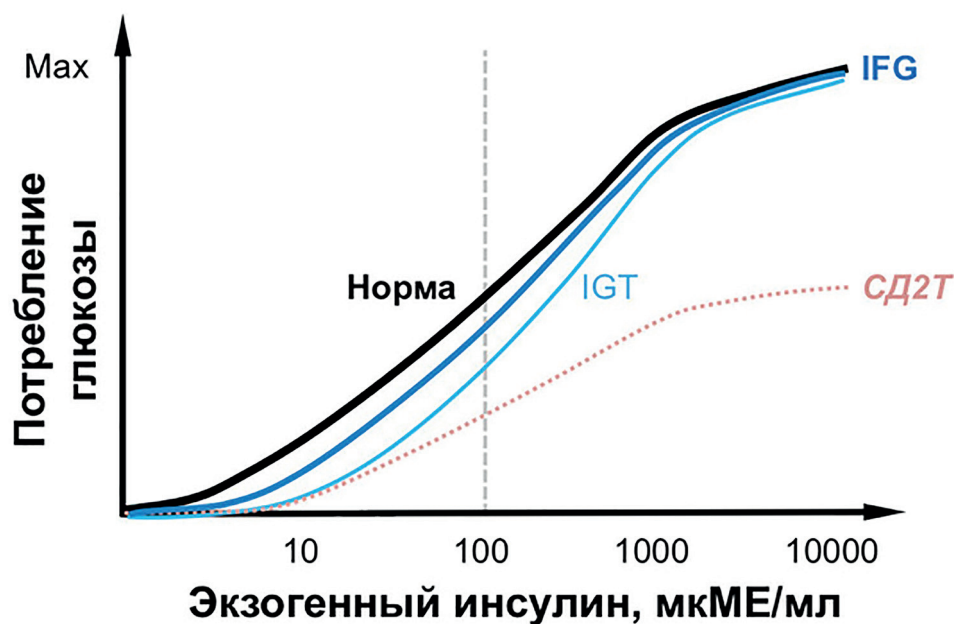
б



в



**Рис. 1.** Референсные значения (а) и изменения уровня глюкозы (б) и инсулина (в) в крови при глюкозотолерантном тесте, стандартно используемые для оценки степени выраженности нарушений углеводного обмена. Зависимости (б) и (в) обобщены по результатам измерений у более чем 5000 добровольцев [20]. В таблице и на оси ординат графиков отмечены референсные значения показателей для определения повышенного уровня глюкозы в крови натощак (IFG), системного нарушения толерантности к глюкозе (IGT) и сахарного диабета 2-го типа (СД2Т). Стрелка отражает сдвиг показателя при длительном течении СД2Т. Уровень инсулина традиционно выражен в международных единицах (миллиэквивалентах, МЕ), количественно отражающих терапевтическое действие инсулина без учета его молекулярной массы (в). Одна единица инсулина эквивалентна 0,0347 мг инсулина, а 100 мкМЕ/мл соответствует концентрации 0,6 пкМ инсулина. С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>)



**Рис. 2.** Изменения зависимости скорости утилизации глюкозы от концентрации экзогенного инсулина на разных стадиях развития ИнсРез и СД2Т. Схематически представлены обобщенные результаты нескольких эугликемических клэмп-тестов с использованием разных равновесных концентраций инсулина [30]. Вертикальная линия соответствует используемой в стандартном клэмп-тесте равновесной концентрации инсулина 100 мкМЕ/мл. Сокращения как на рис. 1

время глюкозы рассчитывается М-индекс системной чувствительности к инсулину. Использование нескольких таких тестов с различной целевой концентрацией инсулина позволило оценить зависимость «концентрация инсулина – потребление глюкозы» [30] (рис. 2). При развитии ИнсРез эта зависимость сдвигается вправо, отражая снижение чувствительности тканей к инсулину (наличие IFG и/или IGT). На поздних стадиях СД2Т снижается не только чувствительность, но и отклик (максимальная реакция на инсулин), отражая дисфункцию  $\beta$ -клеток. Зависимость, показанная на рис. 2, сдвигается вправо и вниз.

Снижение системной чувствительности к инсулину, определяемое с помощью стандартного гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, отражает снижение утилизации глюкозы тканями при наиболее показательной концентрации инсулина в крови – 100 мкМЕ/мл (вертикальный пунктир на рис. 2). Вместе с тем этот тест не позволяет оценить ни максимальный отклик на инсулин, ни реакцию на его разовое введение. Во время клэмп-теста высокий уровень инсулина поддерживается долгое время, после чего обычно берется проба ткани. У здоровых людей и даже у людей с ИнсРез такого продолжительного и выраженного (~100 мкМЕ/мл) увеличения инсулина в крови после приема пищи не наблюдается [22]. Поэтому изменения внутриклеточной сигнализации и генной экспрессии

после клэмп-теста следует интерпретировать с осторожностью. Кроме того, клеточные исследования показали, что инсулин вызывает быстрые (несколько минут) и динамично меняющиеся сигнальные реакции [7, 12, 13, 31, 32], тогда как достижение стационарных условий в клэмп-тесте требует значительного времени. Это значит, что клэмп-тест не идеален для изучения полного спектра молекулярных ответов скелетной мышцы на инсулин.

Альтернативой для изучения молекулярных ответов на инсулин *in vivo* является их измерение в условиях, максимально приближенных к естественным, например, после приема пищи, нормированной на массу тела или основной обмен [22]. Подобный подход был использован для исследования суточных изменений фосфопротеома скелетных мышц у грызунов [33]. Представляется, что он перспективен и для людей при использовании приема глюкозы или смешанной пищи, нормированной на массу тела или основной обмен. У людей с ожирением секреция инсулина после приема пищи значительно выше, что объясняется не только наличием ИнсРез, но и большей массой съеданной пищи. Поэтому такая нормировка позволяет сильнее отразить различия в молекулярных ответах мышцы на инсулин у людей с ИнсРез и нормальным метаболизмом. Этот подход до сих пор не был использован для исследования молекулярных ответов в скелетной мышце человека.

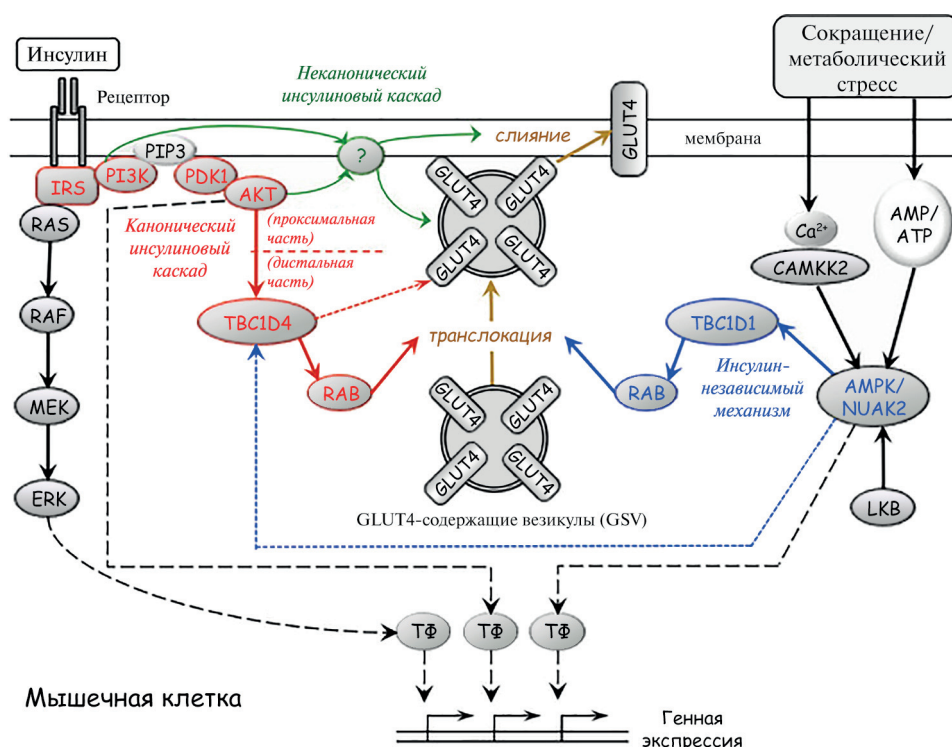


### МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЗАХВАТА ГЛЮКОЗЫ

Молекулярные механизмы возникновения ИнсРез связывают с нарушением внутриклеточной регуляции захвата глюкозы мышечными и жировыми клетками [34]. Дефекты могут касаться непосредственных регуляторов транспорта глюкозы [27, 35] и быть чувствительны к контролирующим их активностью сигнальным молекулам разных каскадов, включая инсулиновый [16, 17] и другие каскады [36]. Эти нарушения также плотно связаны с дисбалансом метаболических потоков при ожирении [23, 25, 27]. Активация захвата глюкозы происходит в несколько стадий, каждая из которых требует своих регуляторов, действующих комбинаторно на разных этапах [37–39]. В состоянии покоя основной инсулинозависимый транспортер глюкозы GLUT4 находится в клетке в специальных везикулах хранения (Glut4 storage vesicles, GSV) [40]. Это стационарные везикулы, удерживаемые в цитозоле и освобождающиеся после связывания набора регуляторов [37]. После этого они перемещаются на периферию, проходят сквозь сеть кортикального

цитоскелета, подстилающего мембрану клетки, позиционируются по отношению к ней и сливаются, экспонируя на поверхность функциональный GLUT4 (рис. 3). Пока нет однозначного понимания, с какими из этих молекул связаны нарушения, возникающие при ИнсРез и СД2Т. Это могут быть и элементы сигнальных каскадов, и их конечные мишени, непосредственно регулирующие перемещение и экспозицию транспортеров глюкозы на поверхность клетки, и их комбинации.

Канонический инсулиновый каскад (рецептор → белок IRS → PI3-киназа → Akt → белок TBC1D4 (AS160) → GTPаза Rab → GLUT4) рассматривается как основной механизм сигнальной активации захвата глюкозы инсулином у животных и человека (рис. 3). Он регулирует преимущественно транслокацию GSV к периферии клетки с участием GAP-белков TBC1D4 (он же AS160) и GTPаз Rab8а и Rab13 (в мышечных клетках) или Rab10 (в адипоцитах) [38, 39]. Однако есть уже много данных о том, что у людей с системной ИнсРез активность этого каскада, измеренная на уровне киназы Akt, снижена не всегда или существенно меньше, чем инсулинозависимый захват глюкозы [27, 41, 42].



**Рис. 3.** Сигнальные механизмы регуляции захвата глюкозы с участием транспортера GLUT4 в мышечной клетке. В дополнение к каноническому инсулиновому каскаду (выделен *красным*), преимущественно регулирующему переход GLUT4-содержащих везикул из цитозоля к клеточной мембране, условный неканонический инсулиновый каскад (показан *зеленым*) регулирует подход, позиционирование и слияние этих везикул с мембраной, обеспечивая экспозицию GLUT4 на поверхности клетки. Инсулиннезависимый механизм с участием AMPK/NUAK2 (выделен *синим*) отвечает за экспозицию GLUT4 и захват глюкозы в ответ на сокращение и возрастание уровня AMP в клетке. Пунктирные линии показывают сопряжение этих каскадов с активацией транскрипционных факторов (ТФ) и генной экспрессии

Этот феномен может быть связан с несколькими причинами. Во-первых, основные нарушения внутри канонического инсулинового каскада могут происходить в его дистальной части, ниже Akt [27]. Во-вторых, они могут быть связаны с самими регуляторами активации GSV в примембранном компартменте [38] или экзоцитоза везикул [39], находящихся под контролем ветвей канонического каскада или других путей передачи сигнала от рецептора инсулина, совокупно представленных как условный неканонический инсулиновый каскад на рис. 3. Наконец, дополнительная активация Akt может достигаться за счет других рецепторов, связанных с PI3-киназным каскадом, но не передающих сигнал к GSV. В этом плане может заслуживать внимания преимущественная роль изоформы Akt2 в регуляции захвата глюкозы [43]. Вопрос о том, могут ли разные рецепторы, например инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), по-разному активировать Akt1 и Akt2 остается открытым.

Необходимость одновременного участия нескольких разных регуляторов на каждой стадии трафика GSV, различие механизмов их активации и комбинаторный характер их действия придают регуляции трафика GSV сложную сетевую структуру. В совокупном виде она условно показана как неканонический инсулиновый каскад на рис. 3. Хотя его детализация выходит за рамки данного обзора и описана в ряде обзоров [35, 37–40], здесь стоит отметить два механизма. Оба механизма необходимы, поскольку регулируют экспозицию транспортеров глюкозы независимо от Akt и дистальной части канонического инсулинового каскада. Один – активация малой GTPазы Rac1 под действием PI3-киназы; Rac1 вызывает перестройку кортикального цитоскелета и обеспечивает подход GSV к мембране клетки. Другой механизм запускается непосредственно от рецептора инсулина, требует ионов  $Ca^{2+}$  и задействует классический комплекс белков SNARE, обеспечивающих слияние GSV с плазматической мембраной и выход транспортеров на поверхность клетки.

Многие регуляторы везикулярного трафика, в том числе TBC1D4/AS160 и GTPазы Rab, регулируют не только какой-то один этап трафика, но и критичны для прохождения других этапов, действуя в комбинации с другими регуляторами. Таким образом, экспозиция транспортеров и захват глюкозы находятся под множественным контролем как канонических, так и неканонических мишеней инсулина, которые пока далеко не все известны [35]. Возможно, что снижение чувствительности захвата глюкозы к

инсулину связано не только с одной из них, а с скоординированными изменениями группы таких мишеней.

Альтернативные механизмы могут регулировать гомеостаз глюкозы натощак (когда уровень инсулина очень низок) и особенно в ответ на сократительную (физическую) активность. Они включают АМР-зависимую протеинкиназу (АМРК) [44] и родственные киназы (рис. 3). Последние образуют группу из 12 ферментов [45], функции которых пока мало понятны. Однако по крайней мере два из них, АМРК-подобные киназы NUAK1 [46] и NUAK2 [47], участвуют в регуляции уровня глюкозы в крови. Как и АМРК, NUAK2 формирует независимый от инсулина механизм регуляции захвата глюкозы с участием АМР и киназы LKB1. В отличие от инсулинового, этот механизм преимущественно опосредован малой GTPазой Rab14 и ее регулятором TBC1D1 [38]. Значимость альтернативных механизмов подтверждается тем, что избирательный для скелетной мышцы нокаут генов, кодирующих рецепторы к инсулину и IGF-1 [48], или изоформ Akt1/2 [49], или сверхэкспрессия Akt2 в скелетной мышце [33] не изменяли чувствительности к инсулину у мышей, в том числе после высокожировой диеты [33], а также тем, что активность АМРК возрастает при физической нагрузке и улучшает захват глюкозы мышцами из кровотока [28], но снижена у людей с ожирением и ИнсРез [50, 51].

Наличие нескольких механизмов регуляции трафика Glut4 и захвата глюкозы в скелетных мышцах значительно расширяет список сигнальных белков, нарушение активности которых может вызывать ИнсРез. Они представляют не только фундаментальный интерес, но и потенциальные мишени антидиабетических препаратов. Изменения активности этих белков у людей с ожирением, ИнсРез или СД2Т могут быть вызваны как изменением их посттрансляционных модификаций (главным образом фосфорилирования), так и изменением содержания в клетке. Учитывая длительность развития ИнсРез и многообразие участников, логично предположить, что нарушения их активности связаны с изменениями активности ряда транскрипционных факторов (ТФ) и генной экспрессии (рис. 3), закрепляющими состояние ИнсРез и последующий диабетический фенотип.

#### **ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т**

Считается, что в каждой ткани экспрессируется до 10 000 белков, без учета их изоформ [52].

В пробах скелетной мышцы редко удается детектировать даже треть от общего количества всех белков и это главным образом высококопийные белки. Наличие высокопредставленных саркомерных белков значительно ограничивает глубину протеомного масс-спектрометрического анализа.

Протеом скелетных мышц людей с метаболическими нарушениями изучался в ряде работ. Наиболее глубокий анализ позволил оценить изменения содержания более 2000 белков у 148 добровольцев (здоровые, пациенты с ИнсРез, без или с СД2Т) [53]. Если только менее 100 белков изменили экспрессию при ИнсРез, то гораздо более масштабные изменения были обнаружены у пациентов с СД2Т. Из более чем 400 белков, которые изменили содержание, только несколько его увеличили. Снизил содержание многие митохондриальные ферменты и транспортеры, регуляторы метаболизма аминокислот, синтеза белка (киназа МТОР (механистическая мишень рапамицина), фактор элонгации 2, белки рибосом), протеосомальные белки и белки теплового шока, а также ряд киназ (киназа легких цепей миозина SPEG, САМК2G, МАРК12 и др.). Увеличили содержание главным образом саркомерные белки, характерные преимущественно для быстрых мышечных волокон (изоформы тяжелых и легких цепей миозина, тропонина, тропомиозина). Интересно, что изменения в содержании белков при СД2Т частично совпали с изменениями уровня их фосфорилирования (см. ниже). Однако протеомный анализ не позволяет предположить механизмы возникновения этих изменений, указывая на важность более детального анализа транскриптома и посттрансляционных модификаций, особенно фосфопротеома.

### ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОПРОТЕОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т

Фосфорилирование является одним из основных способов передачи сигнала в клетке. Существуют сотни киназ, каждая из которых может фосфорилировать несколько субстратов, и общее число сайтов фосфорилирования может достигать 100 000 [54]. Иммуноблоттинг позволяет оценить лишь порядка 10 разных сайтов фосфорилирования в одном исследовании, что определяется доступностью и специфичностью антител. Напротив, фосфопротеомный масс-спектрометрический анализ позволяет одновременно детектировать более 10 000 различных фосфосайтов в составе нескольких тысяч различных белков и на основании этих

данных предсказывать изменение активности фосфорилирующих их киназ. В пробах скелетных мышц в основном детектируются фосфосайты высокопредставленных мышечных белков, но фосфосайты низкокопийных белков удается детектировать гораздо реже. Однако именно они составляют большинство киназ и регуляторных белков. Считается, что даже современные фосфопротеомные методики позволяют детектировать лишь около 10% всех фосфосайтов [54]. Тем не менее фосфопротеомный анализ позволяет гораздо шире охватить изменения спектра фосфорилирования многих белков скелетных мышц, вызванные ИнсРез или СД2Т, как в базальном состоянии (натощак), так и в ответ на инсулин.

**Базальное состояние.** В скелетных мышцах людей с СД2Т не было выявлено серьезных отличий от здоровых людей в базальном уровне фосфорилирования белков канонического инсулинового каскада (в состоянии натощак) ни методом иммуноблоттинга [55–64], ни с помощью целевой масс-спектрометрии [65]. Другие масс-спектрометрические исследования показали лишь небольшие изменения отдельных фосфосайтов в проксимальной (IRS1) [66] и дистальной (TBC1D4) [53] частях каскада. Отсутствие выраженных изменений в инсулиновом каскаде в базальном состоянии при СД2Т согласуется с результатами, полученными для скелетной мышцы крыс после нескольких недель высокожировой диеты, моделирующей ИнсРез [33, 67].

С другой стороны, фосфопротеомное исследование с участием 148 человек с разной степенью метаболических нарушений показало, что в базальном состоянии наблюдаются прогрессирующие изменения при ИнсРез (IFG или IGT) и СД2Т [53]. Преимущественно снижалась активность киназ (оцениваемая по изменению уровня фосфорилирования их субстратов), не входящих в инсулиновый каскад. В том числе это киназы семейства РКС, казеинкиназы СК1/2, кальций/кальмодулин-зависимая киназа II-типа (САМК2), циклин-зависимые киназы CDK, киназа, связанная с миотонической дистрофией (DMPK), CDC2-подобная киназа двойной специфичности, митоген-активируемые киназы (МАР-киназы, МАРК) и другие. Также наблюдались изменения фосфорилирования сократительных и структурных белков (изоформы тяжелых цепей миозина, тропонин, небулин, титин, десмин и др.). Если связь метаболических нарушений с РКС ожидаема [16], то участие казеинкиназы типа I/II (СК1/2) достаточно неожиданно. СК1/2 фосфорилируют сотни субстратов [54], выполняя множество функций,



в частности, фосфорилируя гликогенсинтазу и регулируя обмен гликогена [68]. Эти данные по фосфопротеому человека [53] согласуются с результатами после высокожировой диеты у грызунов [33, 67], дополнительно обнаружившими влияние высокожировой диеты на фосфорилирование белков-регуляторов жирового обмена, воспаления и деградации белков.

Суммируя, влияние ИнсРез и СД2Т на базальный фосфопротеом скелетной мышцы (натошак) остается малоизученным. По имеющимся данным, выраженных изменений в базальной активности канонического инсулинового каскада при СД2Т не происходит. Это дает основание предполагать, что такие изменения отсутствуют и при ИнсРез, а основные различия между здоровыми людьми и пациентами с СД2Т, скорее всего, связаны с реакцией на инсулин. Кроме того, при СД2Т в скелетных мышцах происходят достаточно масштабные изменения фосфорилирования многих других сигнальных белков, принимающих участие в регуляции углеводно-жирового и белкового обмена и воспалительных реакций, которые прямо не связаны с каноническим инсулиновым каскадом, по крайней мере, с его проксимальной частью.

**Стимуляция инсулином.** Гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест наиболее популярен в исследованиях молекулярных ответов скелетной мышцы человека на инсулин. Как правило, в этом тесте концентрация инсулина в крови поддерживается достаточно высокой (~100 мкМЕ/мл) на протяжении нескольких часов. Как и ожидалось, ряд исследований выявил меньший прирост уровня фосфорилирования и/или активности белков канонического инсулинового каскада у людей с СД2Т по сравнению со здоровым контролем [55–62]. Однако в других работах различий обнаружено не было [63, 64, 69]. Фосфопротеомный анализ с помощью целевой масс-спектрометрии выявил относительно небольшие изменения уровня фосфорилирования лишь в нескольких из двух десятков сайтов IRS1 через 0,5, 1 и 4 ч клэмп-теста в мышце людей с СД2Т по сравнению со здоровыми добровольцами [65, 66].

Панорамный фосфопротеомный анализ скелетной мышцы здоровых людей после 2 ч стимуляции инсулином в процессе клэмп-теста показал изменение фосфорилирования ~700 фосфосайтов в более чем 400 белках. Преимущественно изменения наблюдались в сигнальных каскадах киназ АКТ, МТОР и МАРК, а также различных ТФ [70]. Поскольку эти молекулы являются мишенями инсулина, такой результат вполне ожидаем. Исследований,

сопоставлявших влияние инсулина на фосфопротеом скелетной мышцы людей без или с ИнсРез, или с СД2Т мы не обнаружили.

Фосфопротеом скелетной мышцы крыс в период ночной активности, когда животные активно питаются, был сопоставлен с таковым в период дневного отдыха [33]. У животных на жировой диете прирост инсулина после приема пищи был более чем в 2 раза выше, чем у контрольных (что говорит о наличии ИнсРез), но фосфорилирование белков канонического инсулинового каскада сильно не различалось. Это говорит о том, что снижение чувствительности к инсулину при высокожировой диете успешно компенсируется повышенной секрецией инсулина.

Таким образом, только часть исследований обнаружила при метаболических нарушениях отдельные, не всегда ярко выраженные и воспроизводимые, нарушения активации белков канонического инсулинового каскада инсулином в скелетной мышце. Это подтолкнуло к анализу зависимости уровня фосфорилирования этих белков от концентрации инсулина. Оказалось, что в адипоцитах даже малое увеличение фосфорилирования ключевой киназы проксимальной части каскада (Akt) было достаточным для полной активации дистальных элементов (например, Glut4 или транскрипционного фактора Foxo1) [41, 42]. Была выдвинута гипотеза об «избыточности» в клетке молекул проксимальной части каскада (рецептор инсулина, IRS, PI3-киназа и Akt), которые селективно передают сигнал в направлении других, менее представленных, мишеней [27]. Эта гипотеза позволяет объяснить, почему основные нарушения, связанные с ИнсРез, происходят и должны быть более выражены в дистальной части каскада на уровне регуляторов транслокации GSV, но не в проксимальной части, где их обычно ищут и не всегда находят. При этом конкретный механизм «дистальных» нарушений остается пока неизвестным [27].

В упомянутой выше модели [33] повышение эндогенного инсулина в ответ на прием пищи вызывало масштабные изменения фосфорилирования более 2500 сайтов белков в скелетной мышце контрольных крыс и животных на высокожировой диете. Несмотря на разный уровень инсулина у животных этих двух групп, относительное повышение уровня фосфорилирования Akt, mTOR и p70S6K1 (все – мишени инсулина) и снижение уровня фосфорилирования PKA были сходными. Различия наблюдались только в белках-регуляторах метаболизма гликогена. Масштабные межгрупповые различия возникали также после приема пищи и в



степени фосфорилирования ~3000 сайтов белков. Биоинформатический анализ предсказал, что у животных с метаболическими нарушениями активируются киназы СаМК2, рибосомальные киназы p70S6K1 и p90S6K, но снижается активность казеинкиназы СК2 [33]. Поскольку в скелетной мышце людей с СД2Т базальная активность СК2 тоже снижена и активность САМК2 изменена [53], эти результаты указывают на роль СК2 и САМК2 в изменениях внутриклеточной сигнализации в скелетной мышце при развитии ИнсРез и, возможно, СД2Т.

Таким образом, изменения фосфопротеома скелетной мышцы, происходящие при стимуляции инсулином, значительно отличаются в условиях ИнсРез и СД2Т по сравнению со здоровым контролем. Одно из возможных объяснений состоит в том, что при ИнсРез инсулин может связываться с рецепторами IGF-1 и гибридными рецепторами IGF-1/инсулина [71]. Сродство инсулина к этим рецепторам на порядок ниже, чем у IGF-1, и в норме инсулин их не активирует. Однако при компенсаторной гиперинсулинемии в условиях ИнсРез уровень инсулина длительно повышен и вероятность активации рецепторов IGF-1 и гибридных рецепторов возрастает [72]. Уровень IGF-1 также растет в этих условиях, пока уровень глюкозы в крови остается нормальным, но стабилизируется при IFG и падает при СД2Т, тогда как содержание гибридных рецепторов в скелетной мышце растет при ожирении, коррелируя с индексом массы тела [71]. Несмотря на то что все эти рецепторы активируют те же проксимальные звенья каскадов (PI3-киназа → Akt и MAP-киназы (Erk); см. рис. 3), дистальные звенья могут быть не идентичны, вызывая разные сигнальные ответы [73]. Насколько велики эти различия остается вопросом, но масштабность изменений фосфопротеома при ИнсРез предполагает, что они не единичны и лишь могут вносить определенный вклад.

Суммируя, нарушения активации инсулином компонентов канонического инсулинового каскада обнаруживаются далеко не всегда при ИнсРез и СД2Т. Это может быть связано с тем, что основные нарушения происходят в дистальной части каскада, на уровне низкопредставленных регуляторов везикулярного транспорта, в неканонических или других механизмах, регулирующих захват глюкозы. Влияние ИнсРез и СД2Т на фосфопротеом скелетной мышцы при стимуляции инсулином остается практически не изученным. Единственное исследование, изучавшее ответ на эндогенный инсулин после приема пищи в скелетной мышце грызунов в модели с высокожировой диетой, показало,

что изменения фосфопротеома, связанные с ИнсРез, выходят далеко за пределы канонического инсулинового каскада и связаны, в частности, с изменением активности СаМК2, рибосомальных S6-киназ p70S6K1 и p90S6K, а также СК2 [33]. Другие мишени по-прежнему требуют идентификации и подтверждения, по крайней мере, в разных моделях.

### ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ИнсРез и СД2Т

При метаболических нарушениях в скелетной мышце наблюдается изменение уровня фосфорилирования множества киназ как в базальном состоянии [33, 53], так и в ответ на инсулин [33, 70]. Эти киназы регулируют активность сотен белков, включая транскрипционные факторы. Логично предположить, что метаболические нарушения должны вызывать значительные изменения генной экспрессии.

**Базальное состояние.** Изменения базального транскриптома скелетной мышцы человека при СД2Т изучались многократно и выявили значительные отличия по сравнению со здоровым контролем. Один из первых метаанализов, обобщивший 6 исследований, показал, что при СД2Т изменяется экспрессия нескольких сотен генов [74]. Наиболее яркие изменения были связаны со снижением экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, β-окисления жирных кислот и регуляторов метаболизма аминокислот. Снижение экспрессии генов окислительного метаболизма согласуется с последующими большими транскриптомными исследованиями [75, 76] и подтверждается данными протеомного анализа скелетной мышцы людей с СД2Т [53]. Однако другой метаанализ не обнаружил снижения экспрессии этих генов у людей с ИнсРез [77]. Это может объясняться тем, что снижение окислительных возможностей мышц связано не только (и не столько) с ИнсРез, сколько с другими факторами (возраст, уровень двигательной активности и др.). Нарушение экспрессии генов, регулирующих обмен аминокислот при СД2Т, подтвердилось в ряде работ [75–78], так же, как и активация провоспалительных генов и регуляторов убиквитинирования [75, 76]. Эти данные согласуются с повышенным уровнем аминокислот в плазме крови [79] и латентным воспалением в жировой ткани при ожирении [23, 24, 26]. Помимо этого, было обнаружено, что при СД2Т снижена экспрессия мРНК генов белков канонического инсулинового каскада *IRS2*, *PIK3CB*,

*PIK3CA*, *PIK3R1*, *SLC2A4 (GLUT4)* [76], рецепторов инсулина (*INSR*) и IGF-1 (*IGF1R*) и адаптерного белка тирозинкиназных рецепторов (*GRB14*) [77]. При этом величина снижения экспрессии *INSR* и *IRS2* хоть и коррелировала с выраженностью метаболических нарушений, но оказалась очень мала [80].

Какие факторы отвечают за изменение генной экспрессии при ИнсРез и СД2Т? Комплексные изменения в содержании различных субстратов, метаболитов, гормонов и регуляторных факторов в крови и в скелетной мышце не позволяют дать однозначный ответ. Использование биоинформатических подходов в нескольких работах позволило наметить транскрипционные регуляторы, ассоциированные с генами, изменявшими экспрессию при метаболических нарушениях [78, 80]. Однако эти работы были нацелены на поиск регуляторов, связанных с генами белков инсулинового каскада, тогда как регуляторы, связанные с более масштабными изменениями транскриптомного профиля, во многом остались невыясненными.

**Стимуляция инсулином.** Изменения инсулин-независимого транскриптома скелетной мышцы при метаболических нарушениях изучались лишь в единичных работах. Поэтому сначала будут рассмотрены эффекты инсулина в клетках и мышцах здоровых людей.

В первичных миотубах человека динамика транскриптома (0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 ч) была исследована в одной из ранних работ после стимуляции клеток сверхвысокой концентрацией инсулина (1 мкМ) [81]. Оказалось, что уже на самых ранних этапах изменялась (в основном увеличивалась) экспрессия генов ТФ раннего ответа (*FOS*, *SRF*, *EGR1/2*, *JUNB*, *IER3*, *ATF3* и *IDI*), провоспалительных цитокинов и регуляторов ангиогенеза. На более поздних этапах усиливалась экспрессия генов факторов роста и метаболических ферментов, а через 24 ч изменения практически отсутствовали. Результаты этой работы следует интерпретировать с осторожностью из-за очень высокого уровня инсулина, который поддерживался в течение всего эксперимента, тогда как физиологические концентрации инсулина не превышают 1 нМ в течение относительно коротких интервалов [22]. Тем не менее можно заключить, что, по аналогии с различными стресс-воздействиями в разных клеточных культурах [82], инсулин вызывает быструю активацию генов ТФ раннего ответа в миотубах.

В скелетной мышце людей с нормальной чувствительностью к инсулину изменения транскриптома были исследованы только в двух временных точках после стимуляции инсули-

ном в процессе клэмп-теста. Если через 30 мин изменения генной экспрессии отсутствовали [83], то через 3–4 ч менялась экспрессия сотен генов [83–85]. Как и в цитируемом выше исследовании на миотубах [81], инсулин вызывал экспрессию генов провоспалительных цитокинов (*IL17D*, *CCL2*, *CCL8*, *CXCL2*), их рецепторов (*IL1R1*, *IL13R*) и фактора роста (*TGFB2*), а также нескольких десятков генов ТФ. В числе последних были факторы раннего ответа (*EGR1/3*, *IER2*), факторы семейства AP-1 (*JUNB*, *FOS*, *FOSB*), регуляторы гликолиза и окислительного фосфорилирования (*NR4A1* и *NR4A3*), жирового метаболизма (*SREBF1*), факторы инициации транскрипции (*TBPL1*, *BTF3*) и др. [83–85]. Снижение экспрессии было выявлено для миогенных факторов (*MEF2B*, *MYF6*), ключевого регулятора жирового обмена (*PPARG*), ядерных факторов гепатоцитов (*HNF1/2*), рецептора тиреоидного гормона (*THRA*) [85]. Масштабное изменение экспрессии генов ТФ дает основание полагать, что должна изменяться экспрессия множества генов-мишеней в процессе восстановления после стимуляции инсулином. Ключевые эффекты инсулина в скелетной мышце человека (активация захвата глюкозы, синтеза гликогена и МТОР-зависимого синтеза белка) опосредованы посттрансляционной регуляцией. По-видимому, инсулин также может влиять на эти процессы на уровне транскрипции, в том числе усиливая экспрессию генов гексокиназы-2 (*HK2*), рибосомальных белков и ряда факторов, регулирующих трансляцию [84, 85].

В скелетной мышце людей с метаболическими нарушениями направленность изменений экспрессии генов была сопоставима со здоровым контролем в ответ на стимуляцию инсулином в ходе клэмп-теста [86, 87]. Биоинформатический анализ связал эти изменения с участием интерлейкинов, PPAR и ретиноидных рецепторов [86]. В единственной работе, сопоставлявшей ответ на инсулин при метаболических нарушениях, было показано, что через 5 ч клэмп-теста у людей с ИнсРез изменилась экспрессия меньшего числа генов, чем у здоровых индивидов [87]. В частности, это было связано с отсутствием у людей с ИнсРез влияния инсулина на экспрессию генов ключевых ферментов катаболизма углеводов — киназы пируватдегидрогеназы 4, гексокиназы-2 (*HK2*) и др. При этом у людей с ИнсРез инсулин более выраженно активировал гены ТФ, регулирующие жировой метаболизм (*CEBPA* и *SREBF1*).

Суммируя, стимуляция инсулином вызывает масштабные изменения транскриптомного профиля в мышечных клетках, включая увеличение экспрессии генов различных ТФ, цитокинов,

регуляторов углеводно-жирового обмена и синтеза белка. Однако динамика этих изменений и сигнальные пути, их индуцирующие, остаются практически не изученными, так же, как и изменения транскриптомного ответа на инсулин при развитии метаболических нарушений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Развитие ИнсРез и СД2Т тесно связано со снижением инсулинозависимого захвата глюкозы скелетными мышцами, однако молекулярные механизмы этого нарушения до сих пор неизвестны. При СД2Т не всегда обнаруживаются изменения активации и уровня фосфорилирования сигнальных белков проксимальной части канонического инсулинового каскада (от рецептора до АКТ, рис. 3). Обсуждаются гипотезы, объясняющие снижение инсулинозависимого захвата глюкозы дефектами в дистальной части каскада или неканонической инсулиновой сигнализации на уровне регуляции трафика и слияния GSV с плазматической мембраной [27]. Бурное развитие методов количественной панорамной фосфопротеомики значительно расширило представления о сигнальных реакциях на инсулин. Стало ясно, что активация множества киназ и ТФ выходит далеко за рамки канонического инсулинового каскада. Невысокая способность детектировать низкокопийные белки, которые зачастую играют ключевую роль во внутриклеточной передаче сигнала, пока остается существенным ограничением панорамного фосфопротеомного анализа [54]. Совершенствование аппаратных средств и способов пробоподготовки должно увеличить глубину фосфопротеомного анализа и расширить список сигнальных мишеней инсулина. Эти белки представляют фундаментальный интерес и могут быть потенциальными мишенями новых терапевтических препаратов.

Изменения транскриптомного профиля в скелетных мышцах людей с ИнсРез и СД2Т охарактеризованы достаточно подробно для базального состояния. По-видимому, они вызваны изменением многих факторов, включая и циркулирующие в крови, и находящиеся в мышечной ткани, а также тесно связаны с хроническим недостатком двигательной активности. Однако сигнальные механизмы и ТФ, ответственные за эти изменения в мышечных клетках, почти не изучены. Реакции геной экспрессии на острую стимуляцию инсулином нарушены при СД2Т. Эти изменения до сих пор плохо охарактеризованы, так же, как и регулирующие их механизмы.

Прирост эндогенного инсулина, вызванный приемом пищи, значительно больше при ИнсРез, чем в здоровом состоянии и у людей [22], и у животных [33]. При этом уровень глюкозы и свободных жирных кислот в крови здоровых людей и людей с ИнсРез одинаков [22], а у контрольных животных и животных на жировой диете детектируемые различия в проксимальной части канонического инсулинового каскада минимальны, если вообще есть [33]. Это говорит о том, что способность сигнальной системы отвечать на инсулин сохраняется на молекулярном уровне за счет компенсаторного повышения уровня инсулина. Усиление секреции инсулина может быть связано с большим количеством пищи, потребляемой людьми с избыточной массой тела. Это значит, что для понимания молекулярных различий в сигнализации от инсулина важно исследовать ответы на нормированный объем пищи, моделируя ситуацию в жизни. Такие исследования до сих пор отсутствуют.

Метаболические нарушения вызывают в скелетной мышце комплексные изменения в активации сигнальных белков и ТФ, экспрессии мРНК, содержании их белковых продуктов и различных метаболитов. Они происходят как в базальном состоянии, так и в ответ на стимуляцию инсулином. При этом нет ясной картины о взаимосвязи изменений, происходящих на разных уровнях регуляции в клетке. Для одновременной детекции инсулинозависимых изменений на разных уровнях недавно был предложен так называемый «транс-омиксный» подход, который использует комбинацию широкозахватных фосфопротеомных, протеомных, транскриптомных и метаболомных методик с биоинформатическим анализом. Преимущество транс-омиксного анализа состоит в возможности реконструкции не отдельных каскадов, а молекулярных сетей, состоящих из взаимосвязанных друг с другом каскадов. Такой подход уже позволил выявить в клетках гепатомы крысы молекулярные сети, активирующиеся пико- и наномолярными концентрациями инсулина, характерными для базального состояния и ответа на прием пищи соответственно [88]. Оказалось, что в низких концентрациях инсулин преимущественно влияет на фосфорилирование факторов трансляции, Akt и p38 MAPK, изменяя активность ТФ (Foxo1, Creb1 и др.), разнонаправленно регулирующих экспрессию мРНК ферментов гликолиза, регуляторов синтеза жиров и метаболизма аминокислот, изменяя концентрации соответствующих метаболитов. Напротив, в высоких концентрациях инсулин преимущественно



стимулирует Akt и Erk1/2 MAPK, активируя ТФ раннего ответа (Egr1, Hes1 и др.) и увеличивая экспрессию их генов-мишеней, в том числе ряд других ТФ. Подобный подход был недавно экспериментально использован для реконструкции молекулярных сетей (сигнальные белки → ТФ → гены-мишени → регуляторы метаболизма → метаболиты), отвечающих за стимулируемый инсулином рост эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster* S2R+ [89]. В другой работе была одновременно исследована динамика фосфопротеома, транскриптома и протеома [90]. Были реконструированы молекулярные сети, регулирующие содержание различных метаболитов в печени мыши в течение 6 ч после инъекции инсулина. Это позволило понять, что быстрые реакции (изменения углеводного и жирового метаболизма) регулируются на уровне фосфорилирования сигнальных белков, но более поздние (метаболизм аминокислот и нуклеотидов) контролируются дополнительно на уровне экспрессии белков-регуляторов. При этом изменение содержания этих регуляторов происходит главным образом за счет изменения трансляции, а не уровня их мРНК.

Регуляция углеводно-жирового обмена у животных и людей отличается, поэтому использование транс-омиксного анализа для исследования механизмов ИнсРез у человека представляется крайне перспективным направлением. Учитывая ведущую роль скелетной мускулатуры в развитии метаболических нарушений, ближайшие усилия должны быть направлены на комбинирование широкозахватных методов для выяснения молекулярных механизмов развития ИнсРез и СД2Т в скелетной мышце человека.

**Вклад авторов.** Д.В. Попов, А.В. Воротников – концепция обзора; Д.В. Попов, П.А. Махновский, А.В. Воротников – сбор информации, обсуждение результатов исследований, написание и редактирование текста.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10146).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит экспериментов и каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Pino, A., and DeFronzo, R. A. (2019) Insulin resistance and atherosclerosis: implications for insulin-sensitizing agents, *Endocr. Rev.*, **40**, 1447-1467, doi: 10.1210/er.2018-00141.
2. Nencioni, A., Caffa, I., Cortellino, S., and Longo, V. D. (2018) Fasting and cancer: molecular mechanisms and clinical application, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 707-719, doi: 10.1038/s41568-018-0061-0.
3. DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., and Wahren, J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.*, **76**, 149-155, doi: 10.1172/JCI11938.
4. Deer, J., Koska, J., Ozias, M., and Reaven, P. (2015) Dietary models of insulin resistance, *Metabolism*, **64**, 163-171, doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.013.
5. Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C. R., and Accili, D. (2004) Mouse models of insulin resistance, *Physiol. Rev.*, **84**, 623-647, doi: 10.1152/physrev.00032.2003.
6. Kowalski, G. M., and Bruce, C. R. (2014) The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **307**, E859-871, doi: 10.1152/ajpendo.00165.2014.
7. Humphrey, S. J., Yang, G., Yang, P., Fazakerley, D. J., Stockli, J., et al. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2, *Cell Metab.*, **17**, 1009-1020, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.010.
8. Ohno, S., Quek, L. E., Krycer, J. R., Yugi, K., Hirayama, A., et al. (2020) Kinetic trans-omic analysis reveals key regulatory mechanisms for insulin-regulated glucose metabolism in adipocytes, *iScience*, **23**, 101479, doi: 10.1016/j.isci.2020.101479.
9. Krako Jakovljevic, N., Pavlovic, K., Zujovic, T., Kravic-Stevovic, T., Jotic, A., et al. (2021) In vitro models of insulin resistance: Mitochondrial coupling is differently affected in liver and muscle cells, *Mitochondrion*, **61**, 165-173, doi: 10.1016/j.mito.2021.10.001.
10. Li, Z., Lai, Z. W., Christiano, R., Gazos-Lopes, F., Walther, T. C., et al. (2018) Global analyses of selective insulin resistance in hepatocytes caused by palmitate lipotoxicity, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 836-849, doi: 10.1074/mcp.RA117.000560.
11. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Khapchaev, A. Y., Efremov, E. E., Yanushevskaya, E. V., et al. (2021) AICAR protects vascular endothelial cells from oxidative injury induced by the long-term palmitate excess, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, doi: 10.3390/ijms23010211.
12. Batista, T. M., Jayavelu, A. K., Wewer Albrechtsen, N. J., Iovino, S., Lebastchi, J., et al. (2020) A cell-autonomous signature of dysregulated protein phosphorylation underlies muscle insulin resistance in type 2 diabetes, *Cell Metab.*, **32**, 844-859.e845, doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.007.



13. Haider, N., Lebastchi, J., Jayavelu, A. K., Batista, T. M., Pan, H., et al. (2021) Signaling defects associated with insulin resistance in nondiabetic and diabetic individuals and modification by sex, *J. Clin. Invest.*, **131**, doi: 10.1172/JCI151818.
14. Gaster, M. (2019) The diabetic phenotype is preserved in myotubes established from type 2 diabetic subjects: a critical appraisal, *APMIS*, **127**, 3-26, doi: 10.1111/apm.12908.
15. Varemo, L., Henriksen, T. I., Scheele, C., Broholm, C., Pedersen, M., et al. (2017) Type 2 diabetes and obesity induce similar transcriptional reprogramming in human myocytes, *Genome Med.*, **9**, 47, doi: 10.1186/s13073-017-0432-2.
16. Petersen, M. C., and Shulman, G. I. (2018) Mechanisms of insulin action and insulin resistance, *Physiol. Rev.*, **98**, 2133-2223, doi: 10.1152/physrev.00063.2017.
17. White, M. F., and Kahn, C. R. (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress, *Mol. Metab.*, **52**, 101304, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304.
18. American Diabetes Association Professional Practice, C., American Diabetes Association Professional Practice, C., Draznin, B., Aroda, V. R., Bakris, G., Benson, G., Brown, F. M., et al. (2022) 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022, *Diabetes Care*, **45**, S17-S38, doi: 10.2337/dc22-S002.
19. Liu, Y., Li, J., Wu, Y., Zhang, H., Lv, Q., et al. (2022) Evidence from a systematic review and meta-analysis: Classical impaired glucose tolerance should be divided into subgroups of isolated impaired glucose tolerance and impaired glucose tolerance combined with impaired fasting glucose, according to the risk of progression to diabetes, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **13**, 835460, doi: 10.3389/fendo.2022.835460.
20. Wang, Q., Jokelainen, J., Auvinen, J., Puukka, K., Keinanen-Kiukaanniemi, S., et al. (2019) Insulin resistance and systemic metabolic changes in oral glucose tolerance test in 5340 individuals: an interventional study, *BMC Med.*, **17**, 217, doi: 10.1186/s12916-019-1440-4.
21. Frayn, K. N. (2019) Turning over our fat stores: the key to metabolic health Blaxter Award Lecture 2018, *Proc. Nutr. Soc.*, **78**, 398-406, doi: 10.1017/S0029665118002598.
22. McQuaid, S. E., Hodson, L., Neville, M. J., Dennis, A. L., Cheeseman, J., et al. (2011) Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*, **60**, 47-55, doi: 10.2337/db10-0867.
23. Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Y., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Y. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329-1345, doi: 10.1134/S0006297919110099.
24. Stafeev, I. S., Vorotnikov, A. V., Ratner, E. I., Menshikov, M. Y., and Parfyonova, Y. V. (2017) Latent inflammation and insulin resistance in adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2017**, 5076732, doi: 10.1155/2017/5076732.
25. Samuel, V. T., and Shulman, G. I. (2016) The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux, *J. Clin. Invest.*, **126**, 12-22, doi: 10.1172/JCI77812.
26. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P., and Villanueva, C. J. (2022) Adipose-tissue plasticity in health and disease, *Cell*, **185**, 419-446, doi: 10.1016/j.cell.2021.12.016.
27. James, D. E., Stockli, J., and Birnbaum, M. J. (2021) The aetiology and molecular landscape of insulin resistance, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 751-771, doi: 10.1038/s41580-021-00390-6.
28. Sylow, L., Kleinert, M., Richter, E. A., and Jensen, T. E. (2017) Exercise-stimulated glucose uptake – regulation and implications for glycaemic control, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 133-148, doi: 10.1038/nrendo.2016.162.
29. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., and Andres, R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance, *Am. J. Physiol.*, **237**, E214-223, doi: 10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214.
30. Kolterman, O. G., Insel, J., Saekow, M., and Olefsky, J. M. (1980) Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects, *J. Clin. Invest.*, **65**, 1272-1284, doi: 10.1172/JCI109790.
31. Humphrey, S. J., Azimifar, S. B., and Mann, M. (2015) High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 990-995, doi: 10.1038/nbt.3327.
32. Minard, A. Y., Tan, S. X., Yang, P., Fazakerley, D. J., Domanova, W., et al. (2016) mTORC1 is a major regulatory node in the FGF21 signaling network in adipocytes, *Cell Rep.*, **17**, 29-36, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.086.
33. Small, L., Brandon, A. E., Parker, B. L., Deshpande, V., Samsudeen, A. F., et al. (2019) Reduced insulin action in muscle of high fat diet rats over the diurnal cycle is not associated with defective insulin signaling, *Mol. Metab.*, **25**, 107-118, doi: 10.1016/j.molmet.2019.04.006.
34. Samuel, V. T., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism, *Lancet*, **375**, 2267-2277, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4.
35. Klip, A., McGraw, T. E., and James, D. E. (2019) Thirty sweet years of GLUT4, *J. Biol. Chem.*, **294**, 11369-11381, doi: 10.1074/jbc.REV119.008351.
36. Deshmukh, A. S. (2016) Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, **26**, 13-24, doi: 10.1515/hmbci-2015-0041.
37. Bogan, J. S. (2012) Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 507-532, doi: 10.1146/annurev-biochem-060109-094246.
38. Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frenedo-Cumbo, S., Bilan, P. J., and Klip, A. (2017) Update on GLUT4 vesicle traffic: A cornerstone of insulin action, *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 597-611, doi: 10.1016/j.tem.2017.05.002.
39. Leney, S. E., and Tavaré, J. M. (2009) The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling,

- trafficking and potential drug targets, *J. Endocrinol.*, **203**, 1-18, doi: 10.1677/JOE-09-0037.
40. Stockli, J., Fazakerley, D. J., and James, D. E. (2011) GLUT4 exocytosis, *J. Cell Sci.*, **124**, 4147-4159, doi: 10.1242/jcs.097063.
  41. Ng, Y., Ramm, G., Burchfield, J. G., Coster, A. C., Stockli, J., et al. (2010) Cluster analysis of insulin action in adipocytes reveals a key role for Akt at the plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2245-2257, doi: 10.1074/jbc.M109.060236.
  42. Tan, S. X., Ng, Y., Meoli, C. C., Kumar, A., Khoo, P. S., et al. (2012) Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6128-6138, doi: 10.1074/jbc.M111.318238.
  43. Dummmler, B., and Hemmings, B. A. (2007) Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 231-235, doi: 10.1042/BST0350231.
  44. Hayashi, T., Hirshman, M. F., Kurth, E. J., Winder, W. W., and Goodyear, L. J. (1998) Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport, *Diabetes*, **47**, 1369-1373, doi: 10.2337/diab.47.8.1369.
  45. Lizcano, J. M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., et al. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1, *EMBO J.*, **23**, 833-843, doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
  46. Inazuka, F., Sugiyama, N., Tomita, M., Abe, T., Shioi, G., et al. (2012) Muscle-specific knock-out of NUA family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance, *J. Biol. Chem.*, **287**, 16379-16389, doi: 10.1074/jbc.M111.302687.
  47. Koh, H. J., Toyoda, T., Fujii, N., Jung, M. M., Rathod, A., et al. (2010) Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) mediates contraction-stimulated glucose transport in mouse skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15541-15546, doi: 10.1073/pnas.1008131107.
  48. O'Neill, B. T., Lauritzen, H. P., Hirshman, M. F., Smyth, G., Goodyear, L. J., et al. (2015) Differential role of insulin/IGF-1 receptor signaling in muscle growth and glucose homeostasis, *Cell Rep.*, **11**, 1220-1235, doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.037.
  49. Jaiswal, N., Gavin, M. G., Quinn, W. J., III, Lungo, T. S., Gelfer, R. G., et al. (2019) The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis, *Mol. Metab.*, **28**, 1-13, doi: 10.1016/j.molmet.2019.08.001.
  50. Gauthier, M. S., O'Brien, E. L., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J. M., et al. (2011) Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 382-387, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.127.
  51. Xu, X. J., Gauthier, M. S., Hess, D. T., Apovian, C. M., Cacicedo, J. M., et al. (2012) Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue, *J. Lipid Res.*, **53**, 792-801, doi: 10.1194/jlr.P022905.
  52. Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallstrom, B., Hopf, T., et al. (2019) A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues, *Mol. Syst. Biol.*, **15**, e8503, doi: 10.15252/msb.20188503.
  53. Ohman, T., Teppo, J., Datta, N., Makinen, S., Varjosalo, M., et al. (2021) Skeletal muscle proteomes reveal downregulation of mitochondrial proteins in transition from prediabetes into type 2 diabetes, *iScience*, **24**, 102712, doi: 10.1016/j.isci.2021.102712.
  54. Needham, E. J., Parker, B. L., Burykin, T., James, D. E., and Humphrey, S. J. (2019) Illuminating the dark phosphoproteome, *Sci. Signal.*, **12**, doi: 10.1126/scisignal.aau8645.
  55. Krook, A., Roth, R. A., Jiang, X. J., Zierath, J. R., and Wallberg-Henriksson, H. (1998) Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects, *Diabetes*, **47**, 1281-1286, doi: 10.2337/diab.47.8.1281.
  56. Tonks, K. T., Ng, Y., Miller, S., Coster, A. C., Samocha-Bonet, D., et al. (2013) Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects, *Diabetologia*, **56**, 875-885, doi: 10.1007/s00125-012-2811-y.
  57. Albers, P. H., Pedersen, A. J., Birk, J. B., Kristensen, D. E., Vind, B. F., et al. (2015) Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes, *Diabetes*, **64**, 485-497, doi: 10.2337/db14-0590.
  58. Vind, B. F., Birk, J. B., Vienberg, S. G., Andersen, B., Beck-Nielsen, H., et al. (2012) Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes, *Diabetologia*, **55**, 1435-1445, doi: 10.1007/s00125-012-2482-8.
  59. Kim, Y. B., Kotani, K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., and Kahn, B. B. (2003) Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction, *Diabetes*, **52**, 1935-1942, doi: 10.2337/diabetes.52.8.1935.
  60. Kim, Y. B., Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., and Kahn, B. B. (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes, *J. Clin. Invest.*, **104**, 733-741, doi: 10.1172/JCI6928.
  61. Bandyopadhyay, G. K., Yu, J. G., Ofrecio, J., and Olefsky, J. M. (2005) Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle, *Diabetes*, **54**, 2351-2359, doi: 10.2337/diabetes.54.8.2351.
  62. Karlsson, H. K., Zierath, J. R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G. E., et al. (2005) Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects, *Diabetes*, **54**, 1692-1697, doi: 10.2337/diabetes.54.6.1692.

63. Hojlund, K., Staehr, P., Hansen, B. F., Green, K. A., Hardie, D. G., et al. (2003) Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH<sub>2</sub>-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes, *Diabetes*, **52**, 1393-1402, doi: 10.2337/diabetes.52.6.1393.
64. Beeson, M., Sajan, M. P., Dizon, M., Grebenev, D., Gomez-Daspert, J., et al. (2003) Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise, *Diabetes*, **52**, 1926-1934, doi: 10.2337/diabetes.52.8.1926.
65. Karlsson, H. K. R., Kasahara, A., Ikeda, M., Chibalin, A. V., Harada, J., et al. (2021) Quantitative phosphoproteomic analysis of IRS1 in skeletal muscle from men with normal glucose tolerance or type 2 diabetes: A case-control study, *Metabolism*, **118**, 154726, doi: 10.1016/j.metabol.2021.154726.
66. Langlais, P., Yi, Z., Finlayson, J., Luo, M., Mapes, R., De Filippis, E., et al. (2011) Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance, *Diabetologia*, **54**, 2878-2889, doi: 10.1007/s00125-011-2271-9.
67. Sun, Y. N., Huang, J. Q., Chen, Z. Z., Du, M., Ren, F. Z., et al. (2020) Amyotrophy induced by a high-fat diet is closely related to inflammation and protein degradation determined by quantitative phosphoproteomic analysis in skeletal muscle of C57BL/6 J mice, *J. Nutr.*, **150**, 294-302, doi: 10.1093/jn/nxz236.
68. Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., and Tagliabracci, V. S. (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes, *Biochem. J.*, **441**, 763-787, doi: 10.1042/BJ20111416.
69. Meyer, M. M., Levin, K., Grimmsmann, T., Beck-Nielsen, H., and Klein, H. H. (2002) Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease, *Diabetologia*, **45**, 813-822, doi: 10.1007/s00125-002-0830-9.
70. Needham, E. J., Hingst, J. R., Parker, B. L., Morrison, K. R., Yang, G., et al. (2022) Personalized phosphoproteomics identifies functional signaling, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 576-584, doi: 10.1038/s41587-021-01099-9.
71. Haywood, N. J., Slater, T. A., Matthews, C. J., and Wheatcroft, S. B. (2019) The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes, *Mol. Metab.*, **19**, 86-96, doi: 10.1016/j.molmet.2018.10.008.
72. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease, *Endocr. Rev.*, **30**, 586-623, doi: 10.1210/er.2008-0047.
73. Hakuno, F., and Takahashi, S. I. (2018) IGF1 receptor signaling pathways, *J. Mol. Endocrinol.*, **61**, T69-T86, doi: 10.1530/JME-17-0311.
74. Varemo, L., Scheele, C., Broholm, C., Mardinoglu, A., Kampf, C., et al. (2015) Proteome- and transcriptome-driven reconstruction of the human myocyte metabolic network and its use for identification of markers for diabetes, *Cell Rep.*, **11**, 921-933, doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.010.
75. Scott, L. J., Erdos, M. R., Huyghe, J. R., Welch, R. P., Beck, A. T., et al. (2016) The genetic regulatory signature of type 2 diabetes in human skeletal muscle, *Nat. Commun.*, **7**, 11764, doi: 10.1038/ncomms11764.
76. Wu, C., Xu, G., Tsai, S. A., Freed, W. J., and Lee, C. T. (2017) Transcriptional profiles of type 2 diabetes in human skeletal muscle reveal insulin resistance, metabolic defects, apoptosis, and molecular signatures of immune activation in response to infections, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**, 282-288, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.055.
77. Timmons, J. A., Atherton, P. J., Larsson, O., Sood, S., Blokhin, I. O., et al. (2018) A coding and non-coding transcriptomic perspective on the genomics of human metabolic disease, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7772-7792, doi: 10.1093/nar/gky570.
78. Chaudhuri, R., Khoo, P. S., Tonks, K., Junutula, J. R., Kolumam, G., et al. (2015) Cross-species gene expression analysis identifies a novel set of genes implicated in human insulin sensitivity, *NPJ Syst. Biol. Appl.*, **1**, 15010, doi: 10.1038/npjbsa.2015.10.
79. Caballero, B., Finer, N., and Wurtman, R. J. (1988) Plasma amino acids and insulin levels in obesity: response to carbohydrate intake and tryptophan supplements, *Metabolism*, **37**, 672-676, doi: 10.1016/0026-0495(88)90089-3.
80. Cen, H. H., Hussein, B., Botezelli, J. D., Wang, S., Zhang, J. A., et al. (2022) Human and mouse muscle transcriptomic analyses identify insulin receptor mRNA downregulation in hyperinsulinemia-associated insulin resistance, *FASEB J.*, **36**, e22088, doi: 10.1096/fj.202100497RR.
81. Hansen, L., Gaster, M., Oakeley, E. J., Brusgaard, K., Damsgaard Nielsen, E. M., et al. (2004) Expression profiling of insulin action in human myotubes: induction of inflammatory and pro-angiogenic pathways in relationship with glycogen synthesis and type 2 diabetes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 685-695, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.146.
82. Arner, E., Daub, C. O., Vitting-Seerup, K., Andersson, R., Lilje, B., et al. (2015) Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells, *Science*, **347**, 1010-1014, doi: 10.1126/science.1259418.
83. Coletta, D. K., Balas, B., Chavez, A. O., Baig, M., Abdul-Ghani, M., et al. (2008) Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle *in vivo*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **294**, E910-917, doi: 10.1152/ajpendo.00607.2007.
84. Rome, S., Clement, K., Rabasa-Lhoret, R., Loizon, E., Poitou, C., et al. (2003) Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18063-18068, doi: 10.1074/jbc.M300293200.
85. Wu, X., Wang, J., Cui, X., Maianu, L., Rhees, B., et al. (2007) The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle, *Endocrine*, **31**, 5-17, doi: 10.1007/s12020-007-0007-x.

86. Rudkowska, I., Jacques, H., Weisnagel, S. J., Marette, A., and Vohl, M. C. (2013) Transcriptomic profiles of skeletal muscle tissue following an euglycemic-hyperinsulinemic clamp in insulin-resistant obese subjects, *Genes Nutr.*, **8**, 91-98, doi: 10.1007/s12263-012-0298-2.
87. Sears, D. D., Hsiao, G., Hsiao, A., Yu, J. G., Courtney, C. H., Ofrecio, J. M., et al. (2009) Mechanisms of human insulin resistance and thiazolidinedione-mediated insulin sensitization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18745-18750, doi: 10.1073/pnas.0903032106.
88. Kawata, K., Hatano, A., Yugi, K., Kubota, H., Sano, T., et al. (2018) Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks, *iScience*, **7**, 212-229, doi: 10.1016/j.isci.2018.07.022.
89. Terakawa, A., Hu, Y., Kokaji, T., Yugi, K., Morita, K., et al. (2022) Trans-omics analysis of insulin action reveals a cell growth subnetwork which co-regulates anabolic processes, *iScience*, **25**, doi: 10.1016/j.isci.2022.104231.
90. Matsuzaki, F., Uda, S., Yamauchi, Y., Matsumoto, M., Soga, T., et al. (2021) An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver, *Cell Rep.*, **36**, 109569, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109569.

## SIGNALING AND GENE EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE IN TYPE 2 DIABETES: CURRENT RESULTS AND OMICS PERSPECTIVES

### Review

A. V. Vorotnikov<sup>1,2\*</sup>, D. V. Popov<sup>1,3\*</sup>, and P. A. Makhnovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia; E-mail: a.vorotnikov@icloud.com; danil-popov@yandex.ru

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Skeletal muscles primarily contribute to insulin resistance, decreased glucose utilization from the bloodstream and development of type 2 diabetes. Molecular mechanisms that regulate glucose uptake are diverse, including insulin-dependent as the major, but not the only ones. They involve a large range of proteins that control intracellular traffic and exposure of glucose transporters on the cell surface to create an extensive regulatory network. Here, we highlight the advantage of omics approaches for identification of insulin-regulated proteins and genes in human skeletal muscle with varying degrees of metabolic disorders. We discuss methodological aspects of the assessment of metabolic disorders and molecular responses of human skeletal muscle to insulin. The known molecular mechanisms of glucose uptake regulation and the first results of phosphoproteomic and transcriptomic studies are analyzed, which unveiled a large-scale array of insulin targets in muscle cells. They demonstrate that a clear depiction of the changes that occur during metabolic dysfunction requires systemic and combined analysis of the events at different levels of regulation, including signaling pathways, transcription factors, and gene expression. Such an analysis lends perspectives to identify previously undescribed regulatory mechanisms of glucose uptake by skeletal muscle and key regulators as the potential therapeutic targets.

**Keywords:** skeletal muscle, insulin resistance, insulin signaling, AMPK, glucose uptake, phosphoproteome, transcriptome, type 2 diabetes



## РОЛЬ HIF – ФАКТОРА, ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ, В МЕХАНИЗМАХ СТАРЕНИЯ

### Обзор

© 2022 Д.Ш. Джалилова<sup>1\*</sup>, О.В. Макарова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»,  
117418 Москва, Россия; электронная почта: juliajal93@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.07.2022

После доработки 17.08.2022

Принята к публикации 17.08.2022

Известно, что старение сопровождается снижением доставки кислорода ко всем органам и тканям и уменьшением в них его парциального давления, то есть развитием гипоксии. Недостаток кислорода активирует в клетках сигнальный путь индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF, который имеет три изоформы – HIF-1, HIF-2 и HIF-3. HIF регулирует экспрессию нескольких тысяч генов и является потенциальной мишенью для создания новых лекарственных средств для терапии многих заболеваний, в том числе, ассоциированных с возрастом. Организмы человека и лабораторных животных отличаются как по устойчивости к гипоксии, так и по уровням экспрессии HIF и зависимых от него генов, что может обуславливать предрасположенность к развитию воспалительных, опухолевых и сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящее время данные об изменениях уровня экспрессии HIF с возрастом противоречивы, что во многом связано с тем, что исследования, как правило, выполняются на разных возрастных группах, в разных гипоксических условиях, преимущественно *in vitro*, на разных типах клеток и модельных организмах. Кроме того, противоречивые данные об изменениях уровня экспрессии HIF с возрастом могут определяться, в том числе индивидуальной устойчивостью к гипоксии изучаемых организмов, что при проведении исследований не учитывается. Поэтому цель обзора – проанализировать представленные в литературе сведения о взаимосвязи механизмов старения, исходной устойчивости к гипоксии и изменении уровня экспрессии HIF с возрастом. В обзоре обобщены литературные данные о возрастных изменениях устойчивости к гипоксии и экспрессии фактора HIF, его роли в старении, которая связана с такими молекулярными путями, как IIS, сиртуины и mTOR. HIF-1 взаимодействует со многими компонентами IIS-пути, в частности с FOXO, активация которых снижает продукцию активных форм кислорода (АФК) и повышает устойчивость к гипоксии. В условиях недостатка кислорода FOXO активируется как по HIF-зависимому, так и по HIF-независимому путям, что способствует снижению уровня АФК. Показано, что активность HIF-1 регулируется всеми членами семейства сиртуинов, кроме SIRT5, в то время как механизмы взаимодействия сиртуинов с HIF-2 и HIF-3 изучены недостаточно. Выявлена взаимосвязь HIF с mTOR и его ингибитором – AMPK, однако точные механизмы в настоящее время не изучены. Понимание роли HIF и гипоксии в механизмах старения и развитии заболеваний, ассоциированных с возрастом, необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии этих заболеваний и требует проведения дальнейших исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** устойчивость к гипоксии, механизмы старения, HIF, возраст.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090081, **EDN:** BAXJHI

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЛПС – липополисахарид; СВО – системный воспалительный ответ; AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; EPO – эритропоэтин; F1H – фактор, ингибирующий HIF; FOXO – транскрипционные факторы Forkhead box O; GLUT – глюкозный транспортер; HIF – индуцируемый гипоксией фактор; HREs – отвечающие на гипоксию элементы; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; IIS – сигнальный путь инсулина/инсулиноподобного фактора роста; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих; NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»; PHDs – пролилгидроксилазы; PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназа; SIRT – сиртуины; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VHL – E3-убиквитинлигазный комплекс фон Хиппеля–Линдау.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Гипоксия является одним из патогенетических факторов развития многих заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, воспалительных, инфекционных и опухолевых [1, 2]. Клеточный ответ на недостаток кислорода реализуется через сигнальный путь индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF (Hypoxia-Inducible Factor), за открытие которого в 2019 г. была присуждена Нобелевская премия Греггу Семенза (Gregg Semenza), Питеру Рэтклиффу (Peter Ratcliffe) и Уильяму Кэлину (William Kaelin). HIF регулирует экспрессию более 1000 генов – глюкозных транспортеров, фактора роста эндотелия сосудов – *VEGF*, эритропоэтина и др. [1, 3]. HIF имеет три изоформы – HIF-1, HIF-2 и HIF-3, которые различаются по функциональной активности [2, 4–6]. В ответ на гипоксическое воздействие активация HIF-1 способствует адаптации организма и обуславливает индивидуальную устойчивость к недостатку кислорода [7]. Однако активация HIF-1 происходит не только в ответ на гипоксию, но и на продукцию активных форм кислорода (АФК), провоспалительных цитокинов и повышение активности фактора, регулирующего воспалительные процессы – NF-κB (Nuclear Factor-κB) [8, 9].

Старение – процесс постепенного угнетения основных функций организма, в том числе регенераторных и репродуктивных, вследствие чего организм становится менее приспособленным к условиям окружающей среды, теряет способность противостоять стрессам, болезням и травмам, что делает его гибель неизбежной [10]. Известно, что старение, с одной стороны, характеризуется снижением доставки кислорода ко всем органам и тканям, а также уменьшением в них его парциального давления, то есть развитием гипоксии. Одной из причин развития гипоксии при старении является снижение васкуляризации тканей, которое приводит к уменьшению диффузии кислорода к клеткам [11–13]. С другой стороны, старение сопровождается повышением уровня окислительного стресса и активацией провоспалительных реакций, что способствует развитию так называемого инфламэйджинга (inflammaging), т.е. воспаления, ассоциированного с возрастом [14]. Воспаление, в свою очередь, приводит к развитию связанных с возрастом заболеваний, таких как атеросклероз, болезни Альцгеймера и Паркинсона [14, 15].

Поскольку развитие гипоксии, а также повышение уровней АФК и провоспалительных цитокинов, наблюдающиеся при воспа-

лении, приводят к активации HIF-1, этот фактор играет одну из ключевых ролей в развитии возраст-ассоциированных заболеваний. HIF-1, влияющий на процессы ангиогенеза и развитие воспаления, взаимодействует со множеством молекулярных путей, контролирующих развитие возрастных изменений в организме, таких как сиртуины, компоненты сигнального пути инсулина/инсулиноподобного фактора роста IIS (Insulin and IGF-1 Signaling pathway) и серин/треониновая протеинкиназа mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих, Mammalian Target Of Rapamycin).

Известно, что устойчивость к гипоксии у людей и лабораторных животных варьирует и зависит от многих факторов, в том числе от возраста. Показано, что новорожденные организмы являются наиболее устойчивыми к гипоксии [16–19]. Однако данные об изменениях устойчивости к недостатку кислорода в другие периоды постнатального развития противоречивы. Организмы с разной устойчивостью к гипоксии характеризуются значительной индивидуальной вариабельностью уровня экспрессии HIF и зависимых от него генов [20–23].

Различия в исходном уровне экспрессии изоформ HIF и устойчивости к гипоксии, очевидно, могут определять предрасположенность к развитию возраст-зависимых заболеваний.

## HIF

HIF-1 был впервые описан как фактор, регулирующий синтез эритропоэтина (Erythropoietin, EPO) в ответ на низкое содержание кислорода в крови. Он представляет собой гетеродимер, состоящий из конститутивно экспрессирующейся субъединицы HIF-1β (ARNT, Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator, ядерный транслокатор арильного углеводородного рецептора) и одной из регулируемых кислородом изоформ α-субъединиц – HIF-1α, HIF-2α или HIF-3α [1, 2, 4–6].

Все три изоформы α-субъединицы – HIF-1α, HIF-2α и HIF-3α, а также β-субъединица содержат на N-конце домены bHLH (Basic-Helix-Loop-Helix) и PAS (Per-Arnt-Sim), которые требуются для гетеродимеризации α- и β-субъединиц [2, 4–6]. Помимо этого, bHLH-домен димера HIF-α/β необходим для связывания консенсусной последовательности (G/ACGTG), содержащейся в отвечающих на гипоксию элементах – HREs (Hypoxia Response Elements), которые находятся в промотерах и/или энхансерах контролируемых HIF генов [3]. Все α-субъединицы также содержат C-концевые домены кис-

лород-зависимой деградации ODDD (Oxygen-Dependent Degradation Domain), посредством гидроксилирования которых обеспечивается регуляция активности HIF в зависимости от концентрации кислорода [5].

Домены транскрипционной активности С-TAD и N-TAD (Transcriptional Activity Domains), которые расположены на С-конце молекулы белка, обеспечивают взаимодействия HIF с коактиваторами транскрипции, такими как CBP/p300 [CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/p300] [4, 5].

Ген, кодирующий HIF-1 $\alpha$ , экспрессируется во всех клетках и тканях, в то время как, кодирующий HIF-2 $\alpha$  (EPAS, Endothelial PAS domain protein), – преимущественно в легких, хрящах и эндотелии сосудов. Следует отметить, что HIF-2 $\alpha$  имеет 48% аминокислот, идентичных HIF-1 $\alpha$  [2, 8]. Относительно недавно был описан HIF-3 $\alpha$ , который представлен множеством вариантов, наиболее изученным из которых является IPAS (Inhibitory PAS domain protein) [2, 6, 8]. Он является отрицательным регулятором активности субъединиц HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$ , так как конкурирует с ними за HIF-1 $\beta$ . Кроме того, некоторые варианты HIF-3 $\alpha$  димеризуются с HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$ , что предотвращает их ДНК-связывающую способность [2, 5, 6].

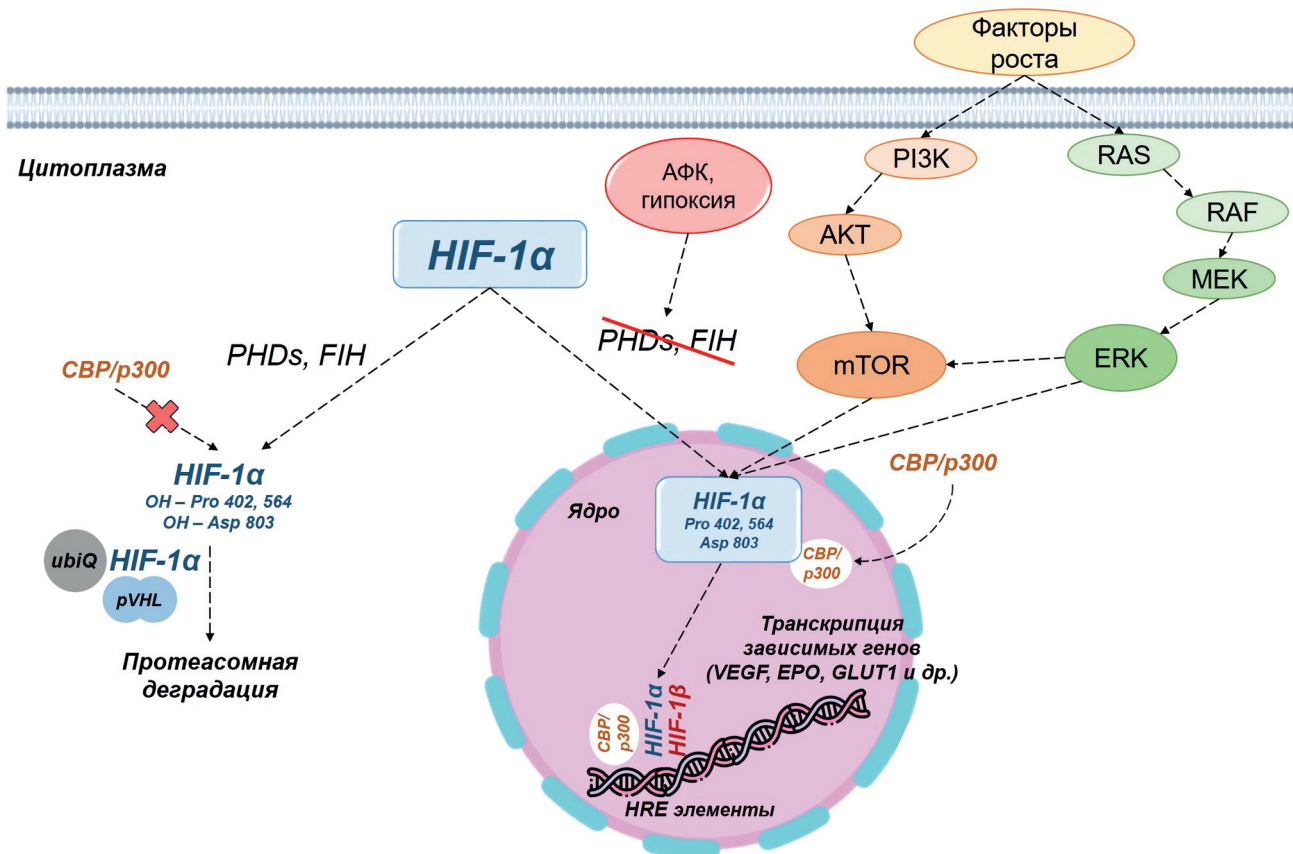
Содержание субъединиц HIF- $\alpha$  регулируется главным образом на посттрансляционном уровне через зависимость от гидроксилирования протеасомную деградацию белка. В условиях нормоксии содержание синтезирующегося *de novo* цитоплазматического белка HIF- $\alpha$  определяется функциональной активностью пролилгидроксилаз и аспарагиновой гидроксилазы. Гидроксилазы – это 2-оксоглутарат и Fe(II)-зависимые диоксигеназы, активность которых полностью зависит от кислорода, и при его отсутствии она подавляется [1, 2, 4, 5, 8]. При достаточном содержании кислорода три пролилгидроксилазы – PHD1, PHD2 и PHD3 (Prolyl Hydroxylase Domain proteins, PHDs) – гидроксилируют пролиновые остатки (рис. 1), расположенные в домене кислород-зависимой деградации ODDD HIF- $\alpha$  [1, 2, 5, 8]. Все три пролилгидроксилазы могут гидроксилировать HIF-1 $\alpha$ , но PHD2 ингибирует преимущественно HIF-1 $\alpha$ , в то время как PHD1 и PHD3 – HIF-2 $\alpha$  [2, 5]. Гидроксилирование пролиновых остатков – ключевой механизм негативной регуляции активности субъединицы HIF- $\alpha$ , поскольку он способствует ее протеасомной деградации с помощью E3-убиквитин-лигазного комплекса Хиппеля–Линдау (Von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ligase Complex) [1, 2, 4, 5, 8]. Таким образом, при нормоксии субъединица

HIF- $\alpha$  в большинстве тканей остается неактивной, и после образования она разрушается в течение 5 мин [4].

В условиях гипоксии содержание субстратов и коактиваторов гидроксилирования (O<sub>2</sub>, Fe(II) и 2-оксоглутарата) снижается, что приводит к ослаблению гидроксилирования HIF- $\alpha$  пролилгидроксилазами. HIF- $\alpha$  накапливается в цитоплазме клеток и впоследствии транслоцируется в ядро, где димеризуется с субъединицей HIF- $\beta$  (рис. 1). Димер HIF- $\alpha$ / $\beta$  присоединяется к HREs, которые расположены в промотерах и/или энхансерах кислород-зависимых генов, вовлеченных в системную и клеточную адаптацию к гипоксии: глюкозных транспортеров (*GLUT1* и *GLUT4*), гликолитических ферментов (альдолазы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы, гексокиназы 2, лактатдегидрогеназы и др.), ангиогенных и гемопоэтических ростовых факторов (*VEGF* и эритропоэтина) [1, 3–5].

Особый член семейства гидроксилаз – фактор, ингибирующий HIF – FIH (Factor-Inhibiting HIF), обеспечивает еще один уровень регуляции функциональной активности HIF- $\alpha$  [1, 2, 4, 5]. FIH специфично гидроксилирует аспарагиновые остатки в С-TAD-домене транскрипционной активации HIF. В условиях нормоксии такая модификация предотвращает взаимодействие HIF- $\alpha$  с коактиваторами транскрипции CBP/p300. FIH имеет меньшую чувствительность к изменению содержания молекулярного кислорода по сравнению с пролилгидроксилазами. В условиях гипоксии FIH ингибируется, что обеспечивает функциональное взаимодействие HIF с коактиваторами и приводит к активации транскрипции зависимых генов [1, 2, 4, 5]. Таким образом, гидроксилирование регулирует функционирование HIF путем влияния на стабильность белка с помощью PHDs и транскрипцию зависимых генов – с помощью FIH (рис. 1).

Стабилизация белка HIF- $\alpha$  может наблюдаться и в условиях нормоксии, что обусловлено чувствительностью пролилгидроксилаз не только к изменению содержания кислорода, но и концентраций АФК, железа, аскорбата и промежуточных продуктов цикла Кребса [4, 8, 24]. Существует множество доказательств того, что генерируемые митохондриями АФК оказывают негативное влияние на активность пролилгидроксилаз. Высокие уровни АФК воздействуют на каталитический домен PHD2, что приводит к снижению ее активности, а также могут индуцировать специфические посттрансляционные модификации, которые ингибируют PHD2. Таким образом, АФК являются фактором



**Рис. 1.** Регуляция активности HIF-1. В условиях нормоксии субъединица HIF-1 $\alpha$  ингибируется гидроксилазами (PHDs, FIH) и разрушается в протеасоме. В условиях гипоксии или под воздействием активации сигнальных путей PI3K и MAPK субъединица HIF-1 $\alpha$  транслоцируется в ядро, димеризуется с HIF-1 $\beta$  и активирует транскрипцию зависимых генов

стабилизации субъединицы HIF-1 $\alpha$ , что в конечном итоге приводит к связыванию HIF-1 с ДНК и активации экспрессии зависимых генов [4, 8].

Кроме того, белок HIF-1 стабилизируется в реакциях, контролируемых такими сигнальными системами (рис. 1), как MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase – активируется на сигналы, способствующие пролиферации) и PI3K (фосфатидилинозитол-3 киназа – регуляторный белок, находящийся на пересечении сигнальных путей и контролирующий ключевые функции клетки, такие как апоптоз и пролиферация) [25–28].

Повышение экспрессии мРНК и стабилизация белка HIF- $\alpha$  наблюдаются в патологии, в частности, при воспалении и развитии опухолей. Описаны механизмы транскрипционной и трансляционной регуляции, включающие соответственно ядерный фактор «каппа-би» NF- $\kappa$ B [9, 28, 29], регулирующий воспалительные процессы, и мишень рапамицина у млекопитающих – mTOR, контролирующей анаболические процессы в клетках [27, 30].

Таким образом, при недостаточном содержании кислорода в организме активируется фактор HIF, который способствует транскрипции адаптивных генов, таких как *EPO*, *VEGF*, глюкозные переносчики и др. Гипоксическая активация субъединиц HIF- $\alpha$  опосредуется гидроксилазами, ингибирование которых при недостаточном содержании кислорода препятствует разрушению HIF- $\alpha$  в протеасоме. Однако активация HIF может наблюдаться и в условиях нормоксии, так как на него оказывают воздействие компоненты сигнальных путей, регулирующих клеточные процессы и воспаление, в том числе MAPK, PI3K и NF- $\kappa$ B.

### ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ

В литературе представлено множество данных о существовании различий у людей и лабораторных животных по устойчивости к гипоксии [7, 20, 31–36]. Кроме того, показано, что организмы с разной устойчивостью к недостатку



кислорода характеризуются значительной индивидуальной вариабельностью уровней экспрессии HIF-1 и зависимых от него генов [20–23]. Среди половозрелых лабораторных животных можно выделить высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии. При этом, по данным литературы и по результатам собственных исследований, у низкоустойчивых к гипоксии крыс экспрессия мРНК и содержание белка HIF-1 в разных органах в условиях нормоксии выше по сравнению с высокоустойчивыми [20, 23]. Однако после воздействия тяжелой гипоксии на критической «высоте» у высокоустойчивых животных происходит более значительное увеличение экспрессии мРНК и содержания белка HIF-1 по сравнению с низкоустойчивыми [32, 34]. У чувствительных к высокогорному отеку легких людей и лиц с определенными полиморфизмами гена *HIF1A*, его экспрессия исходно повышена [33, 37]. Различия в исходном уровне экспрессии изоформ HIF и устойчивости к гипоксии могут обуславливать предрасположенность к развитию и тяжесть течения ряда заболеваний. Так, повышенная экспрессия гена и содержание белка HIF-1 у низкоустойчивых к гипоксии крыс в разных органах может определять их высокую предрасположенность к развитию и тяжелому течению различных, в частности, системных воспалительных заболеваний, так как повышенный уровень HIF-1 может играть провоспалительную роль [2, 20, 23, 24]. Нами показано, что у низкоустойчивых к гипоксии половозрелых животных по сравнению с высокоустойчивыми в ответ на введение липополисахарида (ЛПС) реакции системного воспалительного ответа (СВО) более выражены [23].

Кроме того, установлено, что устойчивость организма к гипоксии зависит от многих факторов, в том числе от возраста. Изучение проблем возрастной устойчивости к кислородной недостаточности начато еще в XIX в. и продолжается до сих пор. В 1878 г. один из первых исследователей влияния гипоксии П. Бер обнаружил, что новорожденные животные по сравнению с половозрелыми более устойчивы к недостатку  $O_2$  [38]. Этот факт был подтвержден другими авторами – новорожденные животные выживают при часовом воздействии тяжелой гипоксии, эквивалентной пребыванию на высоте 13 000 м [16, 17]. Высокая устойчивость к гипоксии новорожденных организмов, а также повышение уровня окислительного стресса в постнатальном онтогенезе установлены рядом исследователей [16–19]. Однако работы по изучению экспрессии ключевого фактора (HIF), обеспечивающего реакцию на гипоксическое воздействие у организмов разного возраста во

взаимосвязи с тяжестью течения воспалительных заболеваний немногочисленны. Нами показано, что тяжесть течения воспалительных заболеваний и уровень экспрессии HIF-1 варьируют в зависимости от возраста и устойчивости к недостатку кислорода [19]. Установлено, что для новорожденных крыс характерна высокая устойчивость к гипоксии, сопряженная с менее выраженным течением СВО, индуцированного ЛПС. Препубертатные животные являются наименее устойчивыми к гипоксии и характеризуются среди других возрастных групп животных (новорожденных и половозрелых) наибольшей тяжестью течения СВО, индуцированного ЛПС [19, 39].

Данные об изменениях устойчивости к гипоксии с возрастом противоречивы. Известно, что у крыс в возрасте до 60 сут. чувствительность к недостатку кислорода подвержена резким колебаниям, а затем она стабилизируется [40]. По данным Середенко [41], старые животные, крысы и собаки, менее устойчивы к гипоксии.

У людей показано, что возраст [42], индекс массы тела [43] и насыщение артериальной крови кислородом [44] имеют взаимосвязь с чувствительностью к острой горной болезни. Тем не менее, по другим данным, эти факторы не влияют на чувствительность к острой горной болезни [45]. Установлено, что молодые люди менее чувствительны к развитию острой горной болезни на высоте 3700 м, чем люди старшего возраста. Однако в это исследование не были включены лица старше 35 лет [42]. В работе Honigman et al. [46] показано, что взрослые люди старше 40–60 лет имеют меньшую тенденцию к развитию острой горной болезни, чем более молодые. Эти данные подтверждаются результатами другого исследования, в котором показано, что у лиц старше 55 лет в 2,6 раза реже развивается острая горная болезнь по сравнению с людьми 25 лет [47]. Напротив, недавно проведенный метаанализ не выявил связи между риском развития острой горной болезни и возрастом [48], однако в данной работе наибольший исследуемый возраст участников был 43,5 года, а наименьший – 11,8 лет.

В проспективном исследовании, проведенном в когорте из 1326 человек, показано, что риск тяжелых высокогорных болезней (острая горная болезнь, высокогорный отек легких и головного мозга) уменьшается с возрастом [49]. Молодой возраст (<46 лет) был связан с повышенным риском тяжелого течения высокогорных болезней. Тем не менее было установлено, что основным физиологическим фактором риска тяжелых высокогорных болезней является периферическая хемочувствительность к ги-

поксии, оцениваемая по показателям функции внешнего дыхания в ответ на гипоксическое воздействие при умеренных физических нагрузках. Согласно шкале для прогнозирования индивидуальной чувствительности к тяжелым высокогорным болезням, возраст старше 46 лет считается защитным фактором у людей, которые ранее бывали в высокогорье [50].

Таким образом, изучение возрастных различий устойчивости к недостатку кислорода и развитию высокогорных болезней остается актуальным, так как они во многом определяют не только развитие и особенности течения адаптивных реакций при гипоксических воздействиях, но и воспалительных, опухолевых и других заболеваний. При этом данные о тяжести течения высокогорных заболеваний в зависимости от возраста в литературе противоречивы, что обусловлено значительной вариабельностью исследуемых групп, в том числе обусловленной индивидуальными различиями в исходной устойчивости к гипоксии и экспрессии фактора HIF.

### ТЕОРИИ СТАРЕНИЯ И HIF

Старение является комплексным процессом, затрагивающим различные уровни биологической организации, начиная с молекулярного и заканчивая организменным [51]. На молекулярном и клеточном уровнях наблюдается повреждение эндоплазматической сети, накопление aberrантных белков и повышение синтеза провоспалительных цитокинов. В свою очередь, воспалительные процессы вызывают альтеративные изменения в клетках и тканях. На уровне организма старение приводит к возникновению и развитию возраст-ассоциированных заболеваний, таких как атеросклероз, болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. Для объяснения явления старения существует более трехсот теорий, каждая из которых предполагает в качестве главной причины возрастной деградации нарушение того или иного биологического процесса.

Согласно теломерной теории, продолжительность жизни определяется способностью клеток к пролиферации [52, 53]. Предел клеточной пролиферации ограничен (лимит Хейфлика): для клеток культуры фибробластов человека он около 50 делений. Механизмы этого явления определяются особенностями организации и репликации концевых районов хромосом — теломер, которые со временем укорачиваются, изменяют свою морфологию и не восстанавливают своей структуры. Теломеры

играют крайне важную роль в клетке: они стабилизируют концы хромосом, препятствуя хромосомным aberrациям. Однако длина теломер может поддерживаться на одном и том же уровне в течение многих клеточных делений с помощью фермента теломеразы. Она достраивает теломеры при репликации ДНК, что практически определяет возможность непрерывного роста клеточной популяции. Следует отметить, что большинство соматических дифференцированных клеток лишено теломеразы. Поэтому длина теломер таких клеток уменьшается по мере делений. При их критическом укорачивании возрастает риск возникновения хромосомных перестроек, которые могут повлечь за собой опухолевую трансформацию клеток [54]. Чтобы этого не случилось, происходит блокирование клеточных делений, и клетка переходит в состояние необратимой остановки клеточного цикла (состояние сенесценции). Сенесцентные клетки остаются жизнеспособными, но утрачивают способность к делению. С одной стороны, это может препятствовать образованию злокачественных опухолей в молодом возрасте, но, с другой стороны, такие клетки секретируют провоспалительные цитокины и хемокины, ростовые факторы, которые, напротив, могут способствовать развитию опухолей в пожилом возрасте [55]. Кроме того, воспалительные процессы и активация NF-κB вызывают развитие заболеваний, ассоциированных с возрастом [14, 15]. Известно, что воспаление взаимосвязано с гипоксией: в проксимальной части промотера гена *HIF1A* содержится NF-κB-связывающий сайт [28, 29]. Обнаружено, что ЛПС вызывает NF-κB-зависимое повышение уровня мРНК и содержания белка HIF-1α [25], а гипоксия, в свою очередь, может активировать NF-κB [56]. Активация NF-κB с возрастом может способствовать активации HIF-1, которая может выполнять как противовоспалительную, так и провоспалительную функции, реализуемые реакциями врожденного и адаптивного иммунитета [2, 9, 23, 24].

Большое распространение получила предложенная Д. Харманом свободно-радикальная теория (MFRTA, Mitochondrial Free Radical Theory of Aging), согласно которой старение вызвано накоплением АФК, продуцируемых митохондриями. Она предполагает, что прогрессирующее накопление клеточных повреждений, вызванных свободными радикалами, образующимися в результате метаболических процессов в митохондриях, приводит к нарушениям в функционировании клеток и старению [51, 57, 58]. При возрастном снижении активности систем, участвующих в нейтрализации АФК, последние

накапливаются в клетке и вызывают повреждение биополимеров: белков, липидов и нуклеиновых кислот [8, 51, 58]. Окислительный стресс и повреждение макромолекул, вызванные увеличением продуцируемых митохондриями АФК, считаются одними из главных факторов старения и были показаны у широкого спектра организмов от дрожжей до человека [58]. Окислительный стресс и повреждение молекул при старении приводят к активации экспрессии фактора NF-κB, регулирующего воспаление, а также HIF-1 [8, 9, 24, 59].

В настоящее время наиболее популярна теория, согласно которой старение вызвано повреждением генетического аппарата клетки. Причем к таким повреждениям относится не только укорачивание теломер по мере клеточных делений, но и мутации генов, кодирующих белки, которые участвуют в регуляции многих жизненно важных клеточных процессов, например, репарации. Skulachev [60] определяет старение как результат осуществления специальных краткосрочных (острый феноптоз) или долгосрочных (хронический феноптоз) программ, закодированных в геноме. «Феноптоз» — генетически запрограммированная смерть организма [60]. Как правило, программа смерти закодирована в геноме гибнущего организма и представляет собой цепь биохимических событий, вызывающих в конечном итоге его самоубийство. Предполагается, что реализация программы старения включает запрограммированное в геноме усиление образования АФК митохондриями. Повреждающий эффект АФК может усиливаться также запрограммированным возрастным ослаблением систем защиты от АФК в митохондриях и других органеллах клетки [60].

Таким образом, несмотря на существование многочисленных теорий старения, очевидно, что важную роль в этом процессе играют АФК. Ключевыми органеллами клетки, ответственными за продукцию АФК, являются митохондрии [35, 61]. В настоящее время имеется огромное количество доказательств того, что митохондриальная дисфункция является обязательной составляющей любой патологии и может рассматриваться как типовой патологический процесс [35].

Животные с разной устойчивостью к гипоксии отличаются особенностями ультраструктурного и функционального состояния митохондрий. Они во многом обуславливают различную способность к адаптации к гипоксии этих животных, предрасположенность и тяжесть течения заболеваний. По сравнению с низкоустойчивыми, у высокоустойчивых

к гипоксии крыс в условиях нормоксии более высокая активность электрон-транспортной функции дыхательной цепи митохондрий коры головного мозга [31, 35].

Увеличивающиеся с возрастом уровни окислительного стресса и АФК блокируют PND2 и способствуют стабилизации HIF-1 и провоспалительной активации клеток [2, 8, 9]. Нами показано, что повышение с возрастом содержания белка HIF-1, которое сопровождается увеличением продукции провоспалительных цитокинов и АФК, более выражено у низкоустойчивых к гипоксии половозрелых крыс Вистар и сопряжено с более тяжелым течением СВО [19, 23, 34]. Это подтверждает ключевую роль HIF в развитии воспалительных и иммунных реакций в онтогенезе.

Кроме того, как упоминалось выше, индуцированная АФК активация NF-κB напрямую повышает экспрессию гена *HIF1A* [9, 25, 28, 29]. Поскольку окислительный стресс связан с активацией HIF-1, он играет одну из ключевых ролей в развитии ассоциированных с возрастом заболеваний. В процессе старения стабилизация белка HIF-1 способствует нарушению работы митохондрий, что приводит к ухудшению энергозависимых клеточных процессов, включая репарацию клеток [62]. Последующее накопление АФК, окисление липидов и белков, а также мутации митохондриальных ДНК ускоряют процесс старения, вызывая ухудшение клеточной энергетики, окислительно-восстановительного статуса клеток, гомеостаза кальция и передачи клеточных сигналов [58, 62]. Следовательно, механизмы, регулирующие HIF-1, участвуют в клеточном старении и патогенезе связанных с ним многих хронических заболеваний. Однако есть виды, в частности голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), у которого, несмотря на повышенный уровень АФК, продолжительность жизни значительно выше по сравнению с близкородственной домовою мышью (*Mus musculus*) [60, 63, 64]. Связь старения, продукции АФК и активации HIF широко обсуждается в литературе, но данные по этому вопросу противоречивы.

Тем не менее, помимо АФК, известны сигнальные пути, регулирующие механизмы старения. К ключевым сигнальным путям, регулирующим старение, в настоящее время относят семейство NAD-зависимых ферментов сиртуинов, различные компоненты пути инсулин/инсулиноподобного фактора роста (IIS) и mTOR-пути [65, 66]. Все они напрямую или опосредованно взаимосвязаны с регуляцией АФК, взаимодействуют с HIF-1 и друг с другом.



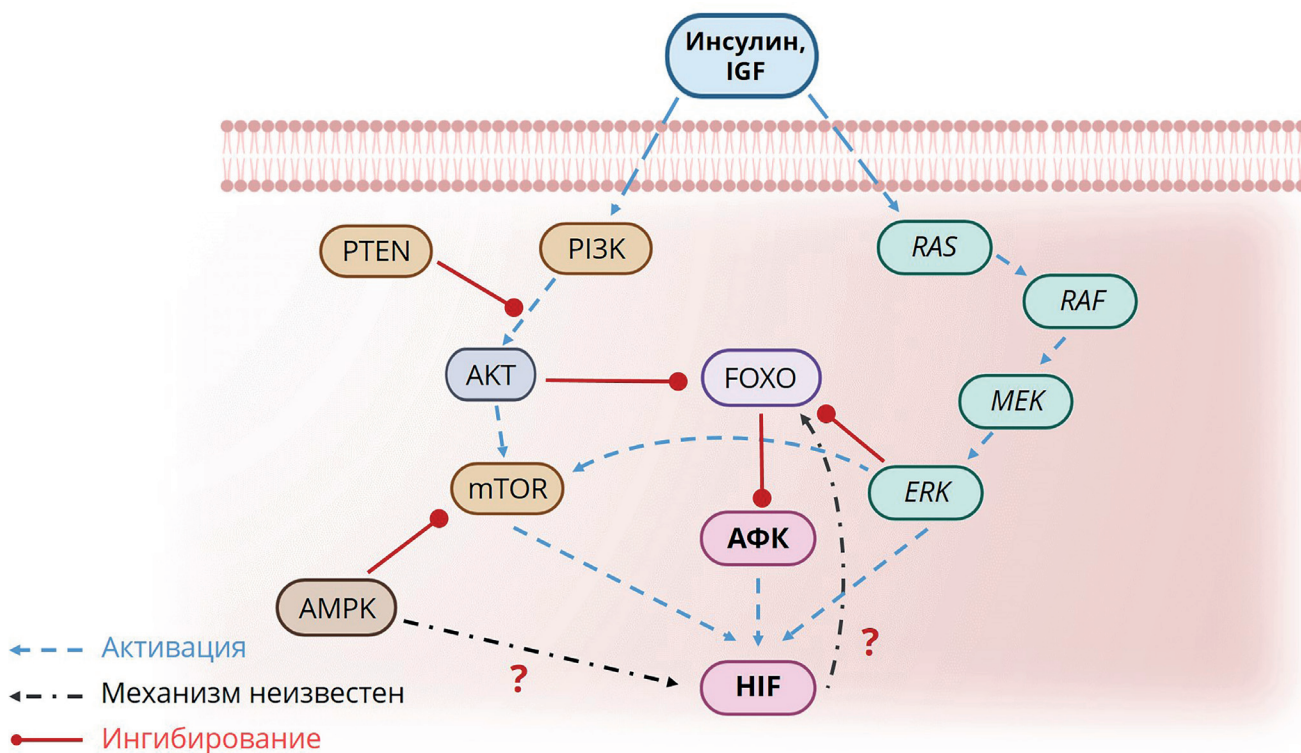
## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ HIF И КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ИНСУЛИНА/ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (IIS)

Сигнальный путь, регулирующий процессы старения – IIS, является эволюционно высококонсервативным и модулирует продолжительность жизни организмов от нематод *Caenorhabditis elegans* до млекопитающих. Снижение уровней циркулирующего IGF-1, уменьшение экспрессии IGF-1R, а также нарушение деградации IGF-1-связывающих белков может заметно увеличить среднюю продолжительность жизни как *C. elegans*, так и млекопитающих [65]. У людей выявлена значительная корреляция между содержанием циркулирующего IGF-1 и развитием ряда злокачественных новообразований, таких как рак молочной железы и простаты [67].

В 1998 г. Zelzer et al. [68] показали, что воздействие инсулина и IGF-1 стимулирует формирование гетеродимерного комплекса HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ , который присоединяется к HREs последовательностям в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и клетках L8 скелетных мышц крыс. Взаимодействие гетеродимера HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  и HREs способствует

активации экспрессии HIF-1-зависимых генов. Дальнейшие исследования подтвердили, что инсулин и IGF-1 индуцируют активацию HIF-1 (рис. 2) через пути PI3K/mTOR [26, 27, 69]. Более того, экспрессия PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), антагониста PI3K/mTOR-пути, ингибирует накопление белка HIF-1, в то время как нарушение функционирования PTEN усиливает PI3K-опосредованную активацию HIF-1-пути [69].

Во многом роль IIS в регуляции продолжительности жизни связана с другими ключевыми регуляторами старения – факторами FOXO. Белки FOXO представляют подсемейство транскрипционных факторов Forkhead family и являются наиболее важными транскрипционными эффекторами IIS-пути [70, 71]. Подсемейство FOXO включает гены *FOXO1*, *FOXO3*, *FOXO4* и *FOXO6*. Белки FOXO у млекопитающих вовлечены в широкий спектр ключевых клеточных процессов, регулирующих устойчивость к стрессу, метаболизм, остановку клеточного цикла и апоптоз [70, 71]. Белки FOXO функционируют как транскрипционные активаторы, связывая последовательность TTGTTTAC [72]. Активность FOXO ингибируется при активации IIS-пути [70, 71]. Инсулин или IGF-1 запускают два основных внутри-



**Рис. 2.** Взаимосвязь HIF-1 с компонентами сигнальных путей IIS и mTOR. Инсулин и IGF-1 индуцируют активацию HIF-1 через PI3K/mTOR, а также путем активации ERK. При активации IIS-пути AKT и ERK ингибируют факторы FOXO, которые регулируют продукцию АФК. АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) и PTEN ингибируют mTOR. Механизмы взаимодействия АМРК и FOXO с HIF требуют дальнейшего изучения



клеточных пути – PI3K/AKT и ERK/MAPK. В результате активации сигнального пути, опосредованного PI3K/AKT, происходит фосфорилирование факторов FOXO с помощью серин/треониновой киназы AKT, а в результате активации ERK/MAPK – с помощью ERK (рис. 2) [70, 71, 73]. Киназа AKT активируется PI3K в присутствии ростовых факторов и инсулина и является главным негативным регулятором белков FOXO [70, 71]. Она фосфорилирует FOXO1, FOXO3 и FOXO4 по нескольким регуляторным сайтам [71]. AKT-опосредованное фосфорилирование FOXO способствует его экспорту из ядра и подавлению транскрипции зависимых от FOXO генов [70, 71]. Напротив, при отсутствии ростовых факторов или в условиях клеточного стресса FOXO транслируются в ядро и активируют FOXO-зависимую экспрессию генов.

Следует отметить, что одна из наиболее значительных функций FOXO-белков – это их роль в реакции клеток на окислительный стресс. Поскольку накопление повреждений, вызванных АФК, является одной из причин старения, факторы FOXO регулируют этот процесс, продолжительность жизни и развитие возраст-зависимых заболеваний путем увеличения синтеза антиоксидантных ферментов и стимуляции репарации ДНК [70, 71, 74]. Факторы FOXO регулируют активность ключевых антиоксидантных ферментов – MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase), каталазы, тиоредоксина Trx2 и др. [70, 71, 74]. Реализация антиоксидантной функции белков FOXO неразрывно связана с их участием в контроле за прохождением фаз клеточного цикла, так как блоки на границе фаз G1/S и в фазах G2/M предоставляют клетке время для детоксикации АФК и репарации, и поэтому эти этапы являются критически важными для клеточного ответа на стресс. Активация репарации ДНК осуществляется белками FOXO посредством запуска экспрессии генов ДНК-связывающего белка GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein) и адаптерного белка DDB1 [75]. Активация белка DAF-16, являющегося гомологом FOXO у *C. elegans*, сопровождается значительным увеличением продолжительности жизни [71, 76]. Инактивация факторов FOXO приводит к внутриклеточному накоплению АФК, которые способствуют развитию атеросклероза, возникновению трансформированных клеток опухолей и снижению пролиферативного потенциала нормальных стволовых клеток [71, 77].

Помимо пути IIS, к инактивации FOXO приводит фосфорилирование киназным ком-

плексом IKK [78]. Все киназы, регулирующие FOXO, – AKT, ERK и IKK – связаны с факторами HIF-1 и NF-κB [9, 25, 79–81]. В ответ на гипоксическое воздействие происходит активация FOXO, которая способствует метаболическому репрограммированию, выживанию клеток и ограничивает продукцию АФК [82–84]. Снижение активности IIS-пути и индукция FOXO повышает устойчивость к гипоксии *C. elegans* и *Danio rerio* [85, 86]. На *Drosophila* показано, что активация FOXO в условиях гипоксии обуславливает высокую устойчивость к недостатку кислорода [84]. При этом FOXO увеличивает экспрессию гена *NF-κB/Relish* и зависимых генов, которые повышают устойчивость к гипоксии. У организмов с мутацией *Relish* выживаемость при гипоксическом воздействии снижается [84]. В нескольких работах показано, что активация FOXO в условиях гипоксии зависит от HIF. Так, в условиях недостатка кислорода FOXO3 активируется по HIF-зависимому (преимущественно HIF-1 и, в меньшей степени, HIF-2) пути, что было установлено *in vitro* на культурах фибробластов и эндотелиальных клеток мыши и человека, а также различных типах опухолевых клеток [82, 83, 87]. Показано, что взаимодействия между HIF-1 и FOXO1 играют ключевую роль в пролиферации, дифференцировке и апоптозе остеобластов, а также способствуют уменьшению уровней АФК [88]. Тем не менее, как и белки HIF, FOXO3 является мишенью протеасомной деградации при гидроксильровании с помощью PHD2, что свидетельствует также о существовании независимого от HIF механизма регуляции FOXO3 кислородом [89]. Эти данные подтверждаются недавним исследованием в условиях *in vivo* на *Drosophila*, в котором установлено, что активация FOXO в условиях гипоксии не зависит от HIF и обусловлена уменьшением активности AKT [84]. Таким образом, HIF-1 взаимодействует со многими компонентами IIS-пути, активируется по PI3K-зависимому механизму и взаимосвязан с FOXO, активация которых снижает продукцию АФК и повышает устойчивость к гипоксии.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ HIF И СИРТУИНОВ

Сиртуины – семейство НАД-зависимых гистоновых деацетилаз, которое впервые было выявлено у дрожжей и представлено Sir2 (*Saccharomyces cerevisiae* silent information regulator 2). Сиртуины являются ключевыми белками, регулирующими процессы старения [62, 65, 66, 90–92]. Показано, что повы-

шенная экспрессия Sir2 увеличивает репликативную продолжительность жизни дрожжей на 30%, а Sir2-ортологи аналогичным образом модулируют продолжительность жизни *C. elegans* и *Drosophila* [62, 65, 66, 90]. У млекопитающих семейство сиртуинов состоит из семи членов – SIRT1–7, активность которых варьирует в зависимости от типа тканей и ферментативных мишеней [62, 65, 66, 90]. Членом семейства сиртуинов, гомологичным с Sir2 дрожжей, у млекопитающих является SIRT1. Сиртуины млекопитающих располагаются в разных компартментах клетки, действуют на различные мишени и могут выполнять ряд функций. Большинство сиртуинов млекопитающих связаны с регуляцией передачи сигналов при окислительном стрессе. Тем не менее основной функцией сиртуинов у млекопитающих является поддержание гомеостаза клетки, в том числе регуляция метаболизма и окислительно-восстановительного баланса, обеспечение антиоксидантной защиты и восстановление повреждений ДНК [66, 90].

SIRT1 является наиболее изученным членом семейства сиртуинов, регулирующим ключевые физиологические и патологические процессы, в том числе апоптоз и воспаление, которые связаны с развитием ассоциированных с возрастом заболеваний. Повышенная активность SIRT1 может препятствовать развитию заболеваний, ассоциированных с возрастом, таких как сахарный диабет, нейродегенеративные и онкологические заболевания [62, 90].

У мышей линии C57BL/6 при активации SIRT1 снижается уровень перекисного окисления липидов в печени и скелетных мышцах, а также повышается уровень супероксиддисмутазы 2 (SOD2) в мышечной ткани [93]. По-видимому, такое действие SIRT1 может быть опосредовано ключевыми редокс-чувствительными факторами транскрипции, включая FOXO3 и p53. Известно, что SIRT1 деацетилюет белок FOXO3, который индуцирует антиоксидантный ответ посредством активации SOD2 и каталазы. Деацетилирование белка FOXO3 при помощи SIRT1 приводит к его активации, что способствует повышению антиоксидантной защиты. Кроме того, FOXO3 регулирует экспрессию митохондриальных генов, что приводит к модуляции уровня АФК [94]. Обычно рассматриваемый как белок-супрессор опухолей, p53 также является редокс-чувствительным белком и мишенью для SIRT1 [95]. При отсутствии клеточного стресса p53 способен снижать образование внутриклеточных АФК и повышать продукцию антиоксидантных белков, таких как SOD2 и глутатионперокси-

даза-1. Нарушение регуляции p53 приводит к повышению внутриклеточных уровней АФК и окислению ДНК [96].

Активация SIRT1 связана с предотвращением преждевременного клеточного старения и патогенеза многих связанных со старением хронических заболеваний [62, 66, 90]. Повышенная экспрессия SIRT1 способствует замедлению старения и увеличению продолжительности жизни, в то время как ингибирование SIRT1 имеет противоположные эффекты. С возрастом уровень экспрессии SIRT1 уменьшается как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях, что нарушает биогенез митохондрий и вызывает развитие заболеваний, ассоциированных с возрастом [62, 90].

В настоящее время выявлены физико-химические и функциональные взаимодействия между некоторыми членами семейства сиртуинов и HIF. В условиях гипоксии SIRT1 деацетилюет HIF-2 $\alpha$  по Lys385, Lys685 и Lys741, это усиливает активность HIF-2, но не HIF-1, что было показано на культурах клеток Hep3B и HEK293 [97]. Деацетилирование HIF-2 $\alpha$  способствует также активации зависимых от него генов, таких как *SOD2* и *EPO* [97]. Авторы предполагают, что HIF-2 $\alpha$  более чувствителен к минимальным изменениям содержания кислорода, чем HIF-1 $\alpha$ , и что SIRT1 необходим для его активации и «тонкой настройки» реакции организма на гипоксию. Однако в дальнейшем было установлено, что деацетилирование HIF-1 $\alpha$  по Lys674 с помощью SIRT1 может подавлять трансактивационную способность HIF-1 в культурах клеток Hep3B, HEK293T и HT1080 [98]. При этом в условиях гипоксии уменьшаются уровни NAD<sup>+</sup>, что снижает активность SIRT1 и увеличивает синтез HIF-1 [98]. Тем не менее в другой работе на культурах клеток Hep3B и HT1080 было показано, что в условиях острой гипоксии активность SIRT1, напротив, увеличивается и зависит от активности HIF-1 и HIF-2 [99]. В работе Laemmle et al. [100] на культуре клеток НСС (Hepatocellular Carcinoma) показано, что в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub> в течение 12, 24 и 48 ч) экспрессия мРНК и содержание белка SIRT1 не изменяются по сравнению с нормоксией, а активность HIF-1 увеличивается. SIRT1 деацетилюет HIF-1, а ингибирование SIRT1 приводит к нарушению функционирования HIF-1 [100]. Показано, что SIRT1 регулирует активность pVHL, способствующего разрушению субъединицы HIF-1 $\alpha$ . Связанное с возрастом уменьшение уровней NAD<sup>+</sup> уменьшает активность SIRT1, что приводит к снижению уровня pVHL и стабилизации HIF-1 $\alpha$  [101].

Таким образом, существуют противоречивые данные о том, какие механизмы участвуют в  $\text{NAD}^+$ -зависимом деацетилировании HIF-1 $\alpha$ , опосредованном SIRT1 [98, 100, 102]. В итоге до сих пор остается неясным, SIRT1 активирует или подавляет HIF-1 [103].

Другой член семейства сиртуинов, SIRT2, так же, как и SIRT1, деацетирует FOXO3 в ответ на окислительный стресс, а также участвует в регуляции клеточного цикла [90]. Взаимосвязь между SIRT2 и HIF-1 $\alpha$  менее изучена, чем между SIRT1 и HIF-1 $\alpha$ . Воздействие ингибитора SIRT2 AK1 способствует увеличению убиквитинирования HIF-1 $\alpha$  в условиях гипоксии (1%  $\text{O}_2$ ) и приводит к разрушению HIF-1 $\alpha$  в протеасоме, что было показано на культурах клеток рака легких человека A549, клетках HeLa и HEK293 [104]. Напротив, установлено, что SIRT2 прямо деацетирует HIF-1 $\alpha$  по Lys709, что дестабилизирует белок в условиях гипоксии (1%  $\text{O}_2$ ) в клетках HeLa, а в клетках с нокаутном гена *SIRT2* содержание белка HIF-1 $\alpha$  высокое [105]. Ацетилирование HIF-1 $\alpha$  по Lys709 увеличивает стабильность белка, поскольку этот сайт также является сайтом убиквитинирования [106]. Нокаут гена *SIRT2* увеличивает содержание белка HIF-1 $\alpha$  и индуцирует экспрессию его генов-мишеней, таких как *VEGF-A* и лактатдегидрогеназа A (*LDHA*), в культуре В-клеток человека и кур (Nalm-6 и DT40 соответственно) [107]. Таким образом, как и в случае SIRT1, молекулярные механизмы взаимодействия SIRT2 и HIF-1 $\alpha$  остаются неясными. Что касается взаимосвязи между SIRT2 и другими членами семейства HIF, показано, что SIRT2 деацетирует HIF-2 $\alpha$ , что приводит к снижению транскрипционной активности генов-мишеней HIF-2 $\alpha$ , в частности, *VEGF-D* в клетках опухолей мягких тканей головы и шеи в условиях гипоксии [108].

При старении антиоксидантная защита митохондрий значительно снижается. Ключевую роль в этом эффекте играет уменьшение уровня SIRT3, стимулирующего важнейшие антиоксидантные системы митохондрий – восстановление глутатиона и активацию SOD2 и каталазы, нейтрализующие АФК [90, 109]. SIRT3 модулирует метаболизм митохондрий и повышает продолжительность жизни экспериментальных животных. Как и другие сиртуины, SIRT3 опосредует деацетилирование ферментов, которые ответственны за снижение образования АФК, что защищает клетки от окислительного стресса, ускоренного старения организма, а также развития ассоциированных с возрастом заболеваний – нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и опухолевых [90].

У мышей, у которых SIRT3 не синтезируется, наблюдается снижение потребления кислорода с одновременным увеличением продукции АФК в клетках и высокими показателями окислительного стресса в скелетных мышцах [109].

Нарушение активности SIRT3 способствует раннему возникновению широкого спектра патологий, связанных со старением [90]. Важную роль в этом процессе играет изменение метаболизма и активация фактора HIF-1. В 2011 г. два независимых исследования показали связь между SIRT3 и HIF-1 $\alpha$  [110, 111]. Они обнаружили, что при делеции SIRT3, приводящей к повышению уровней АФК в клетке, наблюдается ингибирование пролилгидроксилазы и, соответственно, увеличение содержания белка HIF-1 $\alpha$  [110]. Кроме того, делеция SIRT3 увеличивает экспрессию HIF-1 $\alpha$ -зависимых генов, регулируя гликолитический метаболизм и увеличивая зависимость от глюкозы пролиферацию клеток, что способствует прогрессии опухолей [110]. SIRT3 подавляет продукцию АФК, необходимых для индукции HIF-1 $\alpha$ , а гиперэкспрессия SIRT3 предотвращает стабилизацию белка HIF-1 $\alpha$  в условиях гипоксии [111].

SIRT4 локализован в митохондриях и участвует в регуляции продукции АФК, а также в рибозилировании аденозиндифосфата (ADP) [90]. SIRT4 предотвращает индуцированный гипоксией апоптоз в кардиомиобластах H9c2 [112]. Недавно было показано, что SIRT4 напрямую, путем белок-белкового взаимодействия, подавляет синтез HIF-1 [113].

SIRT5 регулирует  $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондриях, цикл мочевины и клеточное дыхание [90, 114]. Функциональная взаимосвязь SIRT5 с HIF-1 в настоящее время не изучена.

SIRT6 играет важную роль в изменении структуры хроматина и рекрутировании транскрипционных факторов, он участвует в репарации ДНК и регулирует темпы старения у млекопитающих, а также ингибирует NF- $\kappa$ B [90]. Защитные эффекты некоторых антиоксидантов обусловлены увеличением активности SIRT1 и SIRT6 в клетках и их негативной регуляцией NF- $\kappa$ B [115]. При ишемии-реперфузии SIRT6 защищает кардиомиоциты от повреждения путем снижения окислительного стресса и активации эндогенных антиоксидантов через ось AMP-активируемой протеинкиназы (AMP activated protein Kinase) AMPK/FOXO3, обеспечивающую устойчивость к окислительному стрессу [116].

Учитывая важную роль SIRT6 в механизмах клеточного гомеостаза, нарушения синтеза этого фермента могут оказывать влияние на развитие различных патологических про-



цессов [90]. Предполагается, что HIF-1 $\alpha$  регулируется SIRT6 [117]. SIRT6 деацетилюет гистоны, локализованные рядом с генами-мишенями HIF-1 $\alpha$ , таким образом деактивируя их промоторы. Тяжелая гипогликемия у мышей с нокаутом гена, кодирующего SIRT6, является результатом поглощения глюкозы клетками, вызванного в значительной степени активацией HIF-1 $\alpha$  [117]. Показано, что гиперэкспрессия SIRT6 способствует стабилизации HIF-1 $\alpha$ , предотвращая его разрушение посредством деубиквитинирования. Кроме того, SIRT6 способствует миграции, пролиферации и способности эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) образовывать трубки [118].

SIRT7 экспрессируется в ядрышке, где осуществляет позитивную регуляцию транскрипции рибосомальной ДНК (рДНК) путем связывания с гистонами [90]. Различный уровень экспрессии мРНК гена, кодирующего SIRT7, обнаруживается во всех тканях, но более высокий наблюдается в тканях с высокой метаболической активностью. При старении у людей уровень синтеза SIRT7 снижается, а у нокаутных по *SIRT7* мышей наблюдается преждевременное старение [119].

В исследованиях *in vitro* показано, что SIRT7 снижает содержание белков HIF-1 и HIF-2 и экспрессию зависимых генов по механизму, не связанному с пролилгидроксилазами и протеасомной или лизосомной деградацией. Кроме того, отрицательное влияние SIRT7 на HIF-1 и HIF-2 не связано с его деацетилазной активностью, а, очевидно, обусловлено другими механизмами. Нокаунт гена, кодирующего SIRT7, приводил к увеличению содержания белков HIF-1 и HIF-2 и их транскрипционной активности [120].

Таким образом, выявлен ряд молекулярных механизмов взаимодействия белков семейства сиртуинов и изоформ HIF (таблица), что позволяет понять роль гипоксии в развитии старения и заболеваний, ассоциированных с возрастом. Наиболее изученными являются взаимосвязи сиртуинов и HIF-1, в то время как механизмы взаимодействия сиртуинов с HIF-2 и HIF-3 изучены недостаточно.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ HIF И КОМПОНЕНТОВ mTOR-ПУТИ

Одним из ключевых сигнальных путей, регулирующих старение и взаимодействующим с HIF, является серин/треониновая протеинкиназа mTOR. Высококонсервативная киназа mTOR у млекопитающих представлена в виде

двух достаточно полно охарактеризованных комплексов – mTOR Complex 1 (mTORC1) и mTOR Complex 2 (mTORC2). mTORC1 известен как сенсор питательных веществ, факторов роста и стресса. При наличии в среде ростовых факторов и питательных веществ mTORC1 регулирует в клетках процессы белкового синтеза, метаболизма и аутофагии. Он контролирует ключевые транскрипционные факторы, ответственные за липогенез – SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), адипогенез – PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ), аутофагию – TFEB (Transcription Factor EB), метаболизм – HIF-1 и воспаление – NF- $\kappa$ B. Комплекс mTORC2 регулирует в клетках пространственную организацию цитоскелета и процессы апоптоза. Результатом активации mTORC1, которая напрямую зависит от наличия в среде или плазме крови ростовых факторов, АТФ, аминокислот и кислорода, является ускорение анаболических процессов – белкового синтеза и пролиферативной активности клеток наряду с одновременным ингибированием процессов катаболизма [121].

Показано, что ингибирование mTOR увеличивает продолжительность жизни у многих видов животных [65, 66, 121]. Роль киназного комплекса mTORC1 в регуляции старения была впервые выявлена с помощью РНК-интерференции у *C. elegans*. Ингибирование mTOR значительно увеличивало продолжительность жизни этих червей, а также *Drosophila* и мышей. Более того, влияние рапамицина на увеличение продолжительности жизни, очевидно, не зависит от внутривидовых различий, этот эффект был обнаружен у мышей разных линий – C57BL/6J, C57BL/6J R, 129/Sv и FVB/N HER-2/neu [65, 66, 121].

Активность mTOR (рис. 2) регулируется преимущественно киназами PI3K/AKT и ERK/MAPK [121]. Кроме того, активность раптора, ключевого белка mTORC1-комплекса, ингибируется АМПК, окислительным стрессом и гипоксией [122, 123]. Повышение активности АМПК способствует увеличению продолжительности жизни [66, 121]. АМПК является точкой взаимосвязи между тремя путями, регулирующими старение – IIS, mTOR и сиртуинами. При голодании АМПК активируется, вследствие чего изменяется внутриклеточный метаболизм, что приводит к повышению уровня NAD<sup>+</sup> и увеличению активности SIRT1 [124]. В результате активации сиртуины могут напрямую деацетилировать и, соответственно, регулировать транскрипционную активность FOXO [94, 124], таким образом взаимодействуя с IIS-путем. Связь между АМПК и сиртуинами



Взаимодействие членов семейства сиртуинов и HIF-1, HIF-2 и HIF-3

Сиртуин	Функция	Эффект на HIF-1	Эффект на HIF-2	Эффект на HIF-3
SIRT1	деацетилюет белок FOXO3; замедляет старение и увеличивает продолжительность жизни	не влияет на HIF-1 [97]; подавляет транскрипционную способность HIF-1 [98]; увеличивает активность HIF-1 [100, 101]	в условиях гипоксии усиливает активность HIF-2 и зависимых генов [97]	
SIRT2	деацетилюет FOXO3; в ответ на окислительный стресс регулирует клеточный цикл	воздействие ингибитора SIRT2 способствует разрушению HIF-1 $\alpha$ в культуре клеток рака легких человека A549, клетках HeLa и HEK293 [104]; деацетилюет HIF-1 $\alpha$ по Lys709, что дестабилизирует белок в условиях гипоксии в клетках HeLa; в клетках с нокаутом гена, кодирующего SIRT2, напротив, содержание белка HIF-1 $\alpha$ высокое [105]; нокаут гена, кодирующего SIRT2, увеличивает содержание белка HIF-1 $\alpha$ и индуцирует экспрессию его генов-мишеней, таких как <i>VEGF-A</i> и <i>LDHA</i> , в культуре В-клеток человека и кур (Nalm-6 и DT40 соответственно) [107]	снижает транскрипционную активность генов-мишеней HIF-2 $\alpha$ , в частности, <i>VEGF-D</i> в клетках опухолей головы и шеи в условиях гипоксии [108]	
SIRT3	регулирует антиоксидантные системы митохондрий	делеция SIRT3 увеличивает содержание белка HIF-1 $\alpha$ и экспрессию зависимых генов [110]; SIRT3 подавляет продукцию АФК, необходимых для индукции HIF-1 $\alpha$ , а гиперэкспрессия SIRT3 предотвращает стабилизацию белка HIF-1 $\alpha$ в условиях гипоксии [111]	не установлен	не установлен
SIRT4	участвует в регуляции продукции АФК в митохондриях, а также в рибозилировании аденозиндифосфата (ADP)	подавляет синтез HIF-1 [113]	не установлен	
SIRT5	регулирует $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондриях, цикл мочевины и клеточное дыхание	не установлен	не установлен	
SIRT6	участвует в репарации, регулирует NF- $\kappa$ B	нокаут <i>SIRT6</i> приводит к увеличению поглощения глюкозы клетками, что обусловлено активацией HIF-1 $\alpha$ [117]; гиперэкспрессия SIRT6 способствует стабилизации HIF-1 $\alpha$ , предотвращая его разрушение посредством деубиквитинирования [118]	не установлен	
SIRT7	регулирует транскрипцию рДНК	снижает содержание белка HIF-1 и экспрессию зависимых генов [120]	снижает содержание белка HIF-2 и экспрессию зависимых генов [120]	

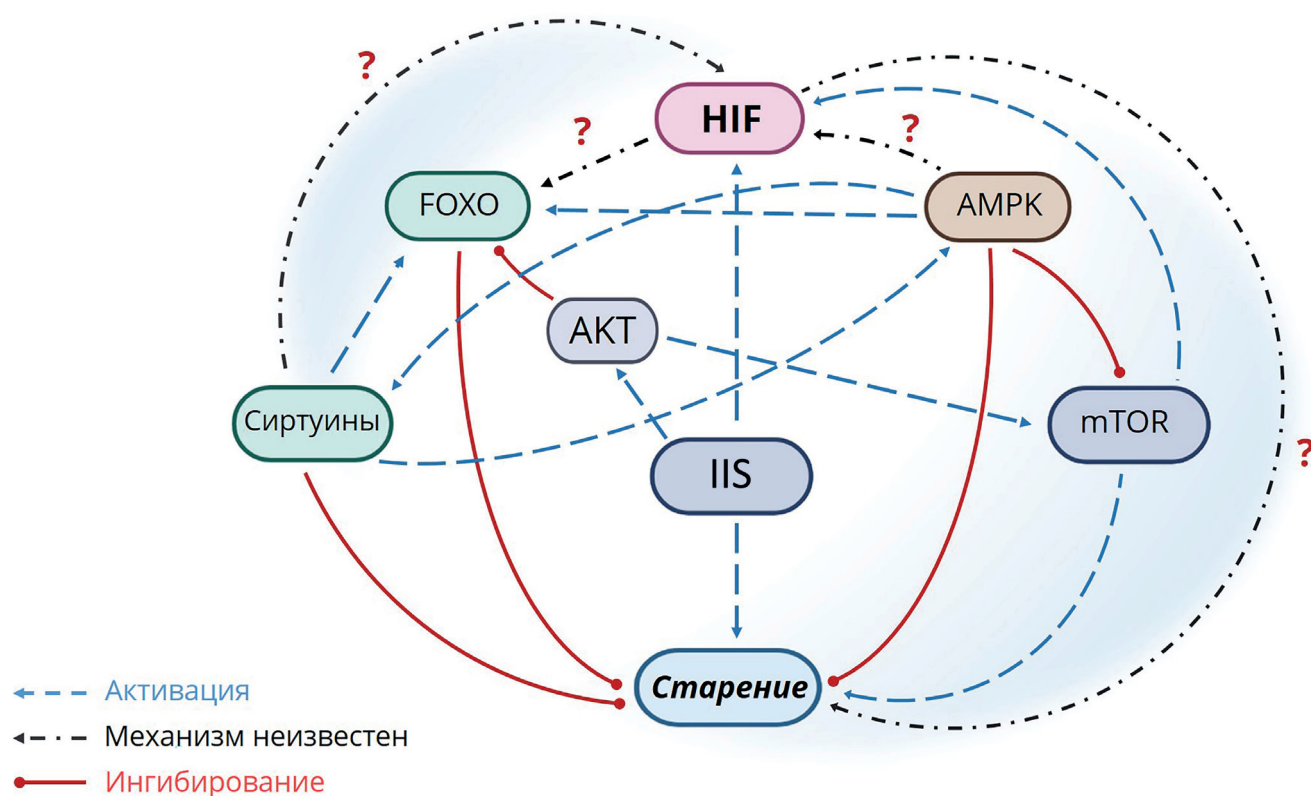
является двунаправленной, поскольку SIRT1 также может деацетилировать печеночную киназу B1 (LKB1 – Liver Kinase B1), которая, в свою очередь, активирует AMPK [125]. Кроме того, показано, что AMPK может активировать белки FOXO как у червей, так и у млекопитающих [126]. Следует отметить, что FOXO1, а также HIF-1 стимулируют экспрессию сестринов, регулирующих активность AMPK и mTOR [127].

mTOR активирует HIF-1 $\alpha$ -путь преимущественно за счет увеличения транскрипции и трансляции HIF-1 $\alpha$  [27, 30]. Кроме того, MAPK, особенно ERK, может фосфорилировать белок HIF-1 $\alpha$  и таким образом увеличивать его активность [25]. Активность HIF-1 может возрастать через путь PI3K/AKT/mTOR как в нормальных, так и в опухолевых клетках. В опухолевых клетках аномальная активация mTOR приводит к накоплению HIF-1 $\alpha$  и стимуляции ангиогенеза [128].

Точные механизмы взаимосвязи AMPK и HIF в настоящее время не изучены. Известно, что AMPK может способствовать активации HIF-1, а ингибирование AMPK снижает активацию HIF-1 в условиях гипоксии [129, 130]. Однако существуют данные о том, что AMPK ингиби-

рует активность пути PI3K/mTOR/HIF-1 $\alpha$  [131]. В некоторых типах опухолевых клеток активность HIF-1 повышена, несмотря на неактивную AMPK [132]. Кроме того, AMPK может стимулировать активность пролилгидроксилаз [133].

Активация AMPK при гипоксии показана в различных типах клеток и тканей, однако конкретные молекулярные механизмы требуют дальнейших исследований [134]. С возрастом активность AMPK увеличивается, однако у старых мышей (24 мес.) по сравнению с молодыми (5 мес.) в ответ на гипоксию (7,9% O<sub>2</sub>) не происходит увеличение функциональной активности AMPK [135]. Авторы предполагают, что хроническое повышение активности AMPK с возрастом может быть необходимо для борьбы с базовым уровнем стресса, с которым сталкивается стареющий организм. Способность воздействия недостатка кислорода вызывать острое повышение активности AMPK может иметь более важное значение для устойчивости к гипоксии, чем повышенный базовый уровень активности AMPK. Таким образом, низкая устойчивость к гипоксии может быть вызвана снижением реакции AMPK на гипоксическое воздействие.



**Рис. 3.** Взаимосвязь молекулярных механизмов, регулирующих старение, с HIF. Активация IIS и mTOR способствует старению, в то время как FOXO и сиртуины, напротив, замедляют возраст-зависимые процессы. При этом IIS и mTOR активируют синтез HIF. AMPK активирует сиртуины и ингибирует mTOR, тем самым препятствуя старению. Данные по взаимодействию сиртуинов, FOXO, AMPK с HIF в настоящее время противоречивы и требуют дальнейших исследований

Хотя активация АМРК в условиях гипоксии может ингибировать mTOR, воздействие гипоксии также может прямо ингибировать mTOR по механизму, независимому от HIF-1 [123, 136, 137]. Ингибирование активности mTOR при гипоксии не полное в связи с тем, что для индукции HIF-1 необходима остаточная активность mTOR [138].

Таким образом, ключевой фактор, обеспечивающий реакцию на гипоксическое воздействие, HIF-1, взаимосвязан с компонентами ПIS-пути, сиртуинами, а также mTOR (рис. 3), играющими ключевую роль в клеточных и молекулярных механизмах старения и возраст-зависимых заболеваниях. Исходная экспрессия HIF-1 различается в зависимости от индивидуальных особенностей организма и устойчивости к гипоксии. Индивидуальные вариации синтеза белка HIF-1 необходимо учитывать при проведении исследований механизмов развития возраст-зависимых заболеваний.

### ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ HIF С ВОЗРАСТОМ

С возрастом функционирование органов и тканей изменяется, снижается их васкуляризация и доставка кислорода к тканям, нарушается диффузия  $O_2$  и его утилизация в митохондриях, что в конечном итоге приводит к развитию тканевой гипоксии, снижению функционального резерва и адаптационных возможностей [10–12]. Гипоксия может влиять на жизненно важные функции организма как на системном, так и на клеточном уровнях и регулировать процессы старения. При развитии возраст-ассоциированных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера и Паркинсона и сахарном диабете II-го типа, отмечается развитие гипоксии, которая может ухудшать их течение. HIF – основной фактор, отвечающий за реакцию организма на изменения концентрации кислорода, и его роль в механизмах старения и развитии возраст-ассоциированных заболеваний во многом определяется видовыми и индивидуальными особенностями организма.

В настоящее время сведения о влиянии HIF на экспрессию генов, регулирующих старение, малоизучены и противоречивы. Показано, что HIF активирует адаптивные реакции на развивающуюся в процессе постнатального онтогенеза гипоксию, которые препятствуют старению, в том числе синтез VEGF и EPO [1, 3, 139]. Кроме того, установлено, что при искусственном увеличении активности HIF-1 улучшаются инотропные реакции кардиомиоцитов старых

крыс (18–20 мес.), что указывает на возможную роль HIF-1 в устойчивости к заболеваниям, связанным с возрастом [140].

Синтез и активность HIF могут снижаться с возрастом, в том числе из-за развития и прогрессирования возраст-ассоциированных заболеваний. При этом нарушение синтеза HIF-1 в мозге у людей пожилого возраста может увеличивать риск развития нейродегенеративных изменений, а повышение синтеза HIF-1 за счет ингибирования пролилгидроксилаз обсуждается в качестве нейропротектора при болезни Альцгеймера [11, 139]. Показано, что снижение активности HIF-1 в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера обуславливает уменьшение содержания GLUT-1 и GLUT-3 по сравнению с лицами того же возраста, не страдающими этим заболеванием. Снижение синтеза GLUT-1 и GLUT-3 ухудшает поглощение и метаболизм глюкозы, что приводит к гиперфосфорилированию тау-белка, отложению его в нейронах и их гибели [141].

Ndubizu et al. [142] исследовали изменения синтеза HIF-1 и зависимых белков (VEGF, GLUT-1, EPO) с возрастом в ответ на гипоксическое воздействие в коре головного мозга крыс разных периодов постнатального развития. Показано, что с возрастом в ответ на гипоксию уменьшается синтез HIF-1 и зависимых белков, однако уровень экспрессии мРНК гена, кодирующего HIF-1, и синтез белка HIF-2 не изменяются. Авторы также показали, что с возрастом в условиях нормоксии увеличивается активность пролилгидроксилаз [142]. На культуре клеток HMVEC (Human dermal Microvascular Endothelial Cells), полученных от новорожденных и 66-летних доноров, было показано уменьшение связывания HIF-1 с HRE и активации HRE-содержащих генов, таких как VEGF, с возрастом [13]. Снижение способности HIF-1 к формированию комплекса с HRE в печени, мозге, легких и почках также было выявлено у старых самок мышей (24 мес.) в условиях гипоксии (7%  $O_2$ ) по сравнению с половозрелыми (2–3 мес.) [143]. В другом исследовании, посвященном PHD3 у крыс, показано, что с возрастом активность этого фермента увеличивается в печени, сердце и скелетных мышцах, и это повышение коррелирует со снижением активности HIF-1 [144]. Ограничение питания, которое у некоторых видов увеличивает максимальную продолжительность жизни и замедляет различные возрастные изменения, у старых крыс предотвращало увеличение активности PHD3 и, соответственно, уменьшение активности HIF-1 [144].



Одной из физиологических особенностей пожилого возраста является снижение адаптивных возможностей организма к ответу на различные виды стресса. С возрастом уменьшается компенсаторная неоваскуляризация в ответ на ишемию тканей [145]. Ухудшение ангиогенеза в ишемизированных тканях у старых животных связано со снижением синтеза белка VEGF. Проведены исследования *in vitro* на культуре первичных гладкомышечных клеток сосудов (VSMCs – Vascular Smooth Muscle Cells), полученных из аорты кроликов в возрасте 6–8 мес. и 4–5 лет. Показано, что в условиях гипоксии (0,1% O<sub>2</sub> в течение 24 ч) уровни экспрессии как мРНК, так и содержание белка VEGF у старых животных увеличивались, но менее значительно, чем у молодых. При этом синтез белка HIF-1 в условиях гипоксии возрастал только в культуре клеток молодых животных. Авторы предполагают, что возрастные нарушения синтеза белка HIF-1 в ответ на гипоксическое воздействие могут обуславливать снижение экспрессии зависимых генов, которые непосредственно участвуют в адаптивных физиологических реакциях на гипоксию [145].

Эти данные свидетельствуют о реципрокной связи между активностью HIF и возрастом, что предполагает снижение регуляторных возможностей системы HIF у пожилых людей. Нарушения молекулярных механизмов адаптации к физиологической гипоксии могут повышать чувствительность пожилых людей к тяжелой гипоксии и/или ишемии.

Однако, наряду с результатами, свидетельствующими о снижении функционирования HIF-1 с возрастом, в литературе представлено значительное количество данных об увеличении активности HIF-1 при старении. В печени крыс, получавших корм *ad libitum*, содержание белка HIF-1 и его ДНК-связывающая активность с возрастом увеличиваются, и это увеличение может быть нивелировано ограничением питания [146, 147]. Кроме того, с возрастом в печени увеличивается содержание HIF-зависимых белков, таких как VEGF, EPO и iNOS [147]. Увеличение синтеза HIF-1 при старении обусловлено окислительным стрессом – увеличением АФК и активных форм азота (АФА), вероятно, за счет ингибирования пролилгидроксилаз и активации MAPK (RAF/MEK/ERK)-пути [146]. Показано, что с возрастом у *C. elegans* нарушения митохондриальной дыхательной цепи, способствующие увеличению уровней АФК, приводят к повышению активности HIF-1 [148].

Следует отметить, что выявлены возрастные различия в экспрессии изоформ HIF. В частности, у здоровых макак-резус пока-

зано повышение экспрессии генов *HIF1A* и *HIF3A* в тканях десны с возрастом. Экспрессия гена *HIF2A* при этом, напротив, была статистически значимо снижена у старых животных по сравнению с молодыми [149].

Как упоминалось выше, в коре больших полушарий головного мозга крыс было показано уменьшение синтеза HIF-1 и зависимых белков с возрастом [142], однако, по данным более позднего исследования [150], в гиппокампе, моторной коре и клетках Пуркинье мозга старых крыс было обнаружено увеличение активности HIF-1 с возрастом, возможно, из-за уменьшения кровоснабжения и доставки к тканям кислорода. Кроме того, в почках у старых крыс (20 мес.) по сравнению с молодыми (4 мес.) увеличивалось содержание белка HIF-1, а также экспрессия мРНК генов, кодирующих VEGF, EPO и GLUT1 [151].

Противоречивые данные об изменении синтеза HIF-1 с возрастом получены в экспериментах на *C. elegans* [152]. Показано, что нокадаун или делеция гена *vhl-1*, приводящие к стабилизации HIF-1, способствуют увеличению продолжительности жизни *C. elegans* на 30–50% и замедлению старения [153]. Роль стабилизации HIF-1 в механизмах увеличения продолжительности жизни остается неизученной. Предполагают, что HIF-1 действует по сигнальному пути, который отличается от IIS и ограничения питания [154]. Помимо нокадауна *vhl-1*, также показано, что в условиях гипоксии (0,5% O<sub>2</sub>) значительно увеличивается продолжительность жизни *C. elegans*, поскольку в этих условиях стабилизируется HIF-1 [153, 155]. Противоположные данные были обнаружены в исследованиях Chen et al. [156] и Zhang et al. [157]. Они показали, что делеция *hif-1* увеличивает продолжительность жизни *C. elegans*. В другом исследовании было подтверждено, что *hif-1* может действовать как отрицательный регулятор продолжительности жизни [158]. При изучении роли HIF-1 в защите от бактериальных токсинов обнаружено, что делеция *hif-1* приводит к увеличению продолжительности жизни, несмотря на то что он необходим для защиты от такого токсина, как цитотоксин *Vibrio cholerae* [158]. Полученные противоречивые данные могут быть связаны с различиями между лабораторными условиями, используемыми для изучения *C. elegans*, и их естественной средой обитания. Таким образом, данные о роли HIF-1 в развитии старения противоречивы и требуют дальнейшего изучения у разных видов организмов.

Результат активации HIF-1 может быть одной из стратегий поиска новых подходов к лечению ишемических и других заболеваний, в

патогенезе которых важную роль играет гипоксия [1], что подчеркивает важность понимания связанных со старением изменений этого пути. Показано, что у старых мышей с пролонгированной активацией субъединицы HIF-1 $\alpha$  улучшается перфузия после ишемии до уровня, аналогичного таковому у молодых мышей, что позволяет предположить, что способность активации HIF-зависимых генов сохранена у старых животных [159]. Следует отметить, что физические упражнения, при которых развивается физиологическая гипоксия, восстанавливают активность HIF-1 $\alpha$  и индуцированную ишемией неоваскуляризацию тканей у старых мышей через P13K-зависимый механизм [160].

Таким образом, ключевой фактор, обеспечивающий реакцию на гипоксическое воздействие, HIF, регулирует экспрессию нескольких тысяч генов и является потенциальной мишенью для создания новых лекарственных средств для терапии многих заболеваний, в том числе, ассоциированных с возрастом. HIF взаимосвязан с компонентами IIS-пути, сиртуинами, а также mTOR, играющими ключевую роль в клеточных и молекулярных механизмах старения и развития возраст-зависимых заболеваний. HIF-1 взаимодействует со многими компонентами IIS-пути, в частности, с FOXO, активация которых снижает продукцию АФК и повышает устойчивость к гипоксии. В условиях недостатка кислорода FOXO активируется как по HIF-зависимому, так и по HIF-независимому пути, что способствует уменьшению уровней АФК. Показано, что активность HIF-1 регулируется всеми членами семейства сиртуинов, кроме SIRT5, в то время как механизмы взаимодействия сиртуинов с HIF-2 и HIF-3 изучены недостаточно. Выявлена взаимосвязь HIF с mTOR и его ингибитором – АМПК, однако точные механизмы в

настоящее время не изучены. Данные по изменению экспрессии HIF с возрастом противоречивы, что во многом связано с тем, что исследования, как правило, выполняются на разных возрастных группах, в разных гипоксических условиях, преимущественно *in vitro*, на разных типах клеток и модельных организмах. Кроме того, различные данные об изменениях синтеза HIF в процессе старения могут определяться, в том числе, индивидуальной устойчивостью к гипоксии изучаемых организмов, что при проведении исследований не учитывается. Понимание роли HIF и гипоксии в механизмах старения и развитии заболеваний, ассоциированных с возрастом, необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии этих заболеваний и требует проведения дальнейших исследований.

**Вклад авторов.** Д.Ш.Д. – анализ данных литературы, подготовка текста обзора и рисунков, О.В.М. – обсуждение собранных данных и редактирование текста.

**Финансирование.** Работа выполнена и финансировалась в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-2573.2022.1.4 «Прогнозирование течения системной воспалительной реакции у старых крыс на основе исходной устойчивости к гипоксии» и бюджетной темы 122030200530-6 «Клеточные и молекулярно-биологические механизмы воспаления в развитии социально значимых заболеваний человека».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Semenza, G. L. (2014) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology, *Annu. Rev. Pathol.*, **9**, 47-71, doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
2. Fitzpatrick, S. F. (2019) Immunometabolism and sepsis: a role for HIF? *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 85, doi: 10.3389/fmolb.2019.00085.
3. Kunej, T. (2021) Integrative map of HIF1A regulatory elements and variations, *Genes*, **12**, 1526, doi: 10.3390/genes12101526.
4. Fratantonio, D., Cimino, F., Speciale, A., and Virgili, F. (2018) Need (more than) two to Tango: Multiple tools to adapt to changes in oxygen availability, *BioFactors*, **44**, 207-218, doi: 10.1002/biof.1419.
5. Koh, M. Y., and Powis, G. (2012) Passing the baton: the HIF switch, *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 364-372, doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.004.
6. Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., and Yamamoto, M. (2017) Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation, *Exp. Cell Res.*, **356**, 182-186, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.013.
7. Dzhaliлова, D. Sh., and Makarova, O. V. (2020) Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics, *Biomedicines*, **8**, 428, doi: 10.3390/biomedicines8100428.

8. Chen, R., Lai, U. H., Zhu, L., Singh, A., Ahmed, M., et al. (2018) Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: the role of hypoxia inducible factors, *Front Cell Dev Biol.*, **6**, 132, doi: 10.3389/fcell.2018.00132.
9. Pham, K., Parikh, K., and Heinrich, E. C. (2021) Hypoxia and inflammation: insights from high-altitude physiology, *Front. Physiol.*, **12**, 676782, doi: 10.3389/fphys.2021.676782.
10. Rose, M. R. (2009) Adaptation, aging, and genomic information, *Aging (Albany NY)*, **1**, 444-450, doi: 10.18632/aging.100053.
11. Ogunshola, O. O., and Antoniou, X. (2009) Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1 $\alpha$  a mediator of neurodegeneration? *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3555-3563, doi: 10.1007/s00018-009-0141-0.
12. Lähteenvuo, J., and Rosenzweig, A. (2012) Effects of aging on angiogenesis, *Circ. Res.*, **27**, 1252-1264, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246116.
13. Ahluwalia, A., Jones, M. K., Szabo, S., and Tarnawski, A. S. (2014) Aging impairs transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in human microvascular endothelial cells: implications for angiogenesis and cell survival, *J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 209-215.
14. Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Alexander, H. D., et al. (2018) Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines, *Front. Immunol.*, **9**, 586, doi: 10.3389/fimmu.2018.00586.
15. Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., et al. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 565-581, doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.
16. Домбровская Ю. Ф. (1961) *Клиника и патогенез гипоксемии растущего организма, Клинико-экспериментальные наблюдения*, Медгиз, Москва.
17. Колчинская А. З. (1964) *Недостаток кислорода и возраст*, Наукова Думка, Киев.
18. Singer, D. (1999) Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **123**, 221-234, doi: 10.1016/s1095-6433(99)00057-4.
19. Dzhaliilova, D. Sh., Kosyreva, A. M., Vishnyakova, P. A., Zolotova, N. A., Tsvetkov, I. S., et al. (2021) Age-related differences in hypoxia-associated genes and cytokine profile in male Wistar rats, *HELIYON*, **7**, e08085, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08085.
20. Кирова Ю. И., Германова Э. Л., Лукьянова Л. Д. (2012) Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **154**, 681-686.
21. Brooks, J. T., Elvidge, G. P., Glenny, L., Gleadle, J. M., Liu, C., et al. (2008) Variations within oxygen-regulated gene expression in humans, *J. Appl. Physiol.*, **106**, 212-220, doi: 10.1152/jappphysiol.90578.2008.
22. Van Patot, M. C., and Gassmann, M. (2011) Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2 $\alpha$ , *High Alt. Med. Biol.*, **12**, 157-167, doi: 10.1089/ham.2010.1099.
23. Dzhaliilova, D. Sh., Kosyreva, A. M., Diatroptov, M. E., Ponomarenko, E. A., Tsvetkov, I. S., et al. (2019) Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats, *J. Inflamm. Res.*, **12**, 73-86, doi: 10.2147/JIR.S194581.
24. Halligan, D. N., Murphy, S. J. E., and Taylor, C. T. (2016) The hypoxia-inducible factor (HIF) couples immunity with metabolism, *Semin. Immunol.*, **28**, 469-477, doi: 10.1016/j.smim.2016.09.004.
25. Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., and Fandrey, J. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B, *Biochem. J.*, **396**, 517-527, doi: 10.1042/BJ20051839.
26. Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., and Du, G. (2018) PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia, *Mol. Med. Rep.*, **18**, 3547-3554, doi: 10.3892/mmr.2018.9375.
27. Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L., and Van Obberghen, E. (2002) Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27975-27981, doi: 10.1074/jbc.M204152200.
28. BelAiba, R. S., Bonello, S., Zähringer, C., Schmidt, S., Hess, J., et al. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4691-4697, doi: 10.1091/mbc.e07-04-0391.
29. Van Uden, P., Kenneth, N. S., and Rocha, S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by NF- $\kappa$ B, *Biochem. J.*, **412**, 477-484, doi: 10.1042/BJ20080476.
30. Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., and Tee, A. R. (2015) mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3, *Oncogene*, **34**, 2239-2250, doi: 10.1038/onc.2014.164.
31. Mironova, G. D., Shigaeva, M. I., Gritsenko, E. N., Murzaeva, S. V., Gorbacheva, O. S., et al. (2010) Functioning of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal's adaptation to hypoxia, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **42**, 473-481, doi: 10.1007/s10863-010-9316-5.
32. Jain, K., Suryakumar, G., Prasad, R., and Ganju, L. (2013) Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia, *High Alt. Med. Biol.*, **14**, 65-77, doi: 10.1089/ham.2012.1064.
33. Soree, P., Gupta, R. K., Singh, K., Desiraju, K., Agrawal, A., et al. (2016) Raised HIF1 $\alpha$  during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers, *Sci. Rep.*, **6**, 26468, doi: 10.1038/srep26468.
34. Dzhaliilova, D. Sh., Diatroptov, M. E., Tsvetkov, I. S., Makarova, O. V., and Kuznetsov, S. L. (2018) Expression of Hif-1 $\alpha$ , Nf- $\kappa$ b, and Vegf genes in the liver and blood serum levels of HIF-1 $\alpha$ , erythropoietin, VEGF, TGF- $\beta$ , 8-isoprostane, and corticosterone in Wistar rats with high and low resistance to hypox-



- ia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165**, 781-785, doi: 10.1007/s10517-018-4264-x.
35. Лукьянова Л. Д. (2019) Сигнальные механизмы гипоксии, РАН, Москва, 215 с.
  36. Kurhaluk, N., Lukash, O., Nosar, V., Portnychenko, A., Portnichenko, V., et al. (2019) Liver mitochondrial respiratory plasticity and oxygen uptake evoked by cobalt chloride in rats with low and high resistance to extreme hypobaric hypoxia, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **97**, 392-399, doi: 10.1139/cjpp-2018-0642.
  37. Tanimoto, K., Yoshiga, K., Eguchi, H., Kaneyasu, M., Ukon, K., et al. (2003) Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance, *Carcinogenesis*, **24**, 1779-1783, doi: 10.1093/carcin/bgg132.
  38. Bert, P. (1878) *La pression barometrique; recherches de physiologie experimentale*, G. Masson, Paris.
  39. Kosyreva, A. M., Dzhalilova, D. S., Tsvetkov, I. S., Diatroptov, M. E., and Makarova, O. V. (2019) Age-specific features of hypoxia tolerance and intensity of lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response in Wistar rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166**, 699-703, doi: 10.1007/s10517-019-04421-3.
  40. Корнеев А. А., Комиссарова И. А., Нарциссов Я. Р. (1993) Использование глутатиона в качестве протекторного средства при гипоксическом воздействии, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **9**, 261-263.
  41. Середенко М. М. (1963) К вопросу о некоторых особенностях реакции старческого организма на острую гипоксию, в кн.: «Кислородная недостаточность», Издательство АН УССР, Киев.
  42. Tang, X. G., Zhang, J. H., Qin, J., Gao, X. B., Li, Q. N., et al. (2014) Age as a risk factor for acute mountain sickness upon rapid ascent to 3,700 m among young adult Chinese men, *Clin. Interv. Aging*, **9**, 1287-1294, doi: 10.2147/CIA.S67052.
  43. Yang, B., Sun, Z.-J., Cao, F., Zhao, H., Li, C.-W., et al. (2015) Obesity is a risk factor for acute mountain sickness: A prospective study in Tibet railway construction workers on Tibetan plateau, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **19**, 119-122.
  44. Guo, G., Zhu, G., Sun, W., Yin, C., Ren, X., et al. (2014) Association of arterial oxygen saturation and acute mountain sickness susceptibility: a meta-analysis, *Cell Biochem. Biophys.*, **70**, 1427-1432, doi: 10.1007/s12013-014-0076-4.
  45. Ziaee, V., Yunesian, M., Ahmadinejad, Z., Halabchi, F., Kordi, R., et al. (2003) Acute mountain sickness in Iranian trekkers around mount Damavand (5671m) in Iran, *Wild. Environ. Med.*, **14**, 214-219, doi: 10.1580/1080-6032(2003)14[214:amsiit]2.0.co;2.
  46. Honigman, B., Theis, M. K., Koziol-McLain, J., Roach, R., Yip, R., et al. (1993) Acute mountain sickness in a general tourist population at moderate altitudes, *Ann. Intern. Med.*, **118**, 587-592, doi: 10.7326/0003-4819-118-8-199304150-00003.
  47. Gaillard, S., Dellasanta, P., Loutan, L., and Kayser, B. (2004) Awareness, prevalence, medication use, and risk factors of acute mountain sickness in tourists trekking around the Annapurnas in Nepal: a 12-year follow-up, *High Alt. Med. Biol.*, **5**, 410-419, doi: 10.1089/ham.2004.5.410.
  48. Wu, Y., Zhang, C., Chen, Y., and Luo, Y. J. (2018) Association between acute mountain sickness (AMS) and age: a meta-analysis, *Mil. Med. Res.*, **5**, 14, doi: 10.1186/s40779-018-0161-x.
  49. Richalet, J. P., Larmignat, P., Poitrine, E., Letournel, M., and Canoui-Poitaine, F. (2012) Physiological risk factors for severe highaltitude illness: A prospective cohort study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **185**, 192-198, doi: 10.1164/rccm.201108-1396OC.
  50. Canoui-Poitaine, F., Veerabudun, K., Larmignat, P., Letournel, M., Bastuji-Garin, S., et al. (2014) Risk prediction score for severe high altitude illness: A Cohort Study, *PLoS One*, **9**, e100642, doi: 10.1371/journal.pone.0100642.
  51. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
  52. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
  53. Olovnikov, A. M. (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, *Exp. Gerontol.*, **31**, 443-448, doi: 10.1016/0531-5565(96)00005-8.
  54. Carneiro, M. C., Henriques, C. M., Nabais, J., Ferreira, T., Carvalho, T., et al. (2016) Short telomeres in key tissues initiate local and systemic aging in Zebrafish, *PLoS Genet.*, **12**, e1005798, doi: 10.1371/journal.pgen.1005798.
  55. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., et al. (2019) The senescence-associated secretory phenotype and its regulation, *Cytokine*, **117**, 15-22, doi: 10.1016/j.cyto.2019.01.013.
  56. Cummins, E. P., Berra, E., Comerford, K. M., Ginouves, A., Fitzgerald, K. T., et al. (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase- $\beta$ , giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18154-18159, doi: 10.1073/pnas.0602235103.
  57. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**, 298-300, doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
  58. Pomatto, L. C. D., and Davies, K. J. A. (2018) Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing, *Free Radic. Biol. Med.*, **124**, 420-430, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016.
  59. Korbecki, J., Simińska, D., Gąssowska-Dobrowolska, M. (2021) Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF- $\kappa$ B activation: a review of the molecular mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10701, doi: 10.3390/ijms221910701.
  60. Skulachev, V.P. (2012) What is "phenoptosis" and how to fight it? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 689-706, doi: 10.1134/S0006297912070012.
  61. Zorov, D. B., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Vorobjev, I. A., Pevzner, I. B., et al. (2017) Mitochondrial aging: is there a mitochondrial clock? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 1171-1179, doi: 10.1093/gerona/glw184.



62. Yuan, Y., Cruzat, V. F., Newsholme, P., Cheng, J., Chen, Y., and Lu, Y. (2016) Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis, *Mech. Ageing Dev.*, **155**, 10-21, doi: 10.1016/j.mad.2016.02.003.
63. Saldmann, F., Viltard, M., Leroy, C., and Friedlander, G. (2019) The Naked Mole Rat: a unique example of positive oxidative stress, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019, 4502819, doi: 10.1155/2019/4502819.
64. Liam, E., Tina, W., Maria, R., and Matthew, E. P. (2022) Naked Mole-Rat cortex maintains reactive oxygen species homeostasis during in vitro hypoxia or ischemia and reperfusion, *Curr. Neuropharmacol.*, doi: 10.2174/1570159X20666220327220929.
65. Pan, H., and Finkel, T. (2017) Key proteins and pathways that regulate lifespan, *J. Biol. Chem.*, **292**, 6452-6460, doi: 10.1074/jbc.R116.771915.
66. Yu, M., Zhang, H., Wang, B., Zhang, Y., Zheng, X., et al. (2021) Key signaling pathways in aging and potential interventions for healthy aging, *Cells*, **10**, 660, doi: 10.3390/cells10030660.
67. Milman, S., Huffman, D. M., and Barzilai, N. (2016) The somatotrophic axis in human aging: framework for the current state of knowledge and future research, *Cell Metab.*, **23**, 980-989, doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.014.
68. Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., and Cohen, B. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF1 $\alpha$ /ARNT, *EMBO J.*, **17**, 5085-5094, doi: 10.1093/emboj/17.17.5085.
69. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., et al. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression, *Genes Dev.*, **14**, 391-396.
70. Murtaza, G., Khan, A. K., Rashid, R., Muneer, S., Hasan, S. M. F., et al. (2017) FOXO transcriptional factors and long-term living, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2017**, 3494289, doi: 10.1155/2017/3494289.
71. Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., et al. (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors, *Redox Biol.*, **6**, 51-72, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.
72. Xuan, Z., and Zhang, M. Q. (2005) From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 209-215, doi: 10.1016/j.mad.2004.09.021.
73. Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., et al. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1, *Cell Signal.*, **19**, 519-527, doi: 10.1016/j.cellsig.2006.08.015.
74. Kops, G. J. P. L., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W. A., et al. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress, *Nature*, **419**, 316-321, doi: 10.1038/nature01036.
75. Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., et al. (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein, *Science*, **296**, 530-534, doi: 10.1126/science.1068712.
76. Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G. I., Lee, L., et al. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*, *Nature*, **389**, 994-999, doi: 10.1038/40194.
77. Tsuchiya, K., Westerterp, M., Murphy, A. J., Subramanian, V., Ferrante, A.W., et al. (2013) Expanded granulocyte/monocyte compartment in myeloid-specific triple FoxO knockout increases oxidative stress and accelerates atherosclerosis in mice, *Circ. Res.*, **112**, 992-1003, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300749.
78. Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, Fu, et al. (2004) IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a, *Cell*, **117**, 225-237, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00302-2.
79. Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase, *Curr. Biol.*, **9**, 601-604, doi: 10.1016/s0960-9822(99)80265-6.
80. Chen, P. S., Chiu, W. T., Hsu, P. L., Lin, S. C., Peng, I. C., et al. (2020) Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases, *J. Biomed. Sci.*, **27**, 63, doi: 10.1186/s12929-020-00658-7.
81. Lappano, R., Todd, L. A., Stanic, M., Cai, Q., Maggolini, M., et al. (2022) Multifaceted interplay between hormones, growth factors and hypoxia in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, **14**, 539, doi: 10.3390/cancers14030539.
82. Bakker, W. J., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2007) FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2, *Mol. Cell*, **28**, 941-953, doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.035.
83. Jensen, K. S., Binderup, T., Jensen, K. T., Therkelsen, I., Borup, R., et al. (2011) FoxO3a promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function, *EMBO J.*, **30**, 4554-4570, doi: 10.1038/emboj.2011.323.
84. Barretto, E. C., Polan, D. M., Beevor-Potts, A. N., Lee, B., and Grewal, S. S. (2020) Tolerance to hypoxia is promoted by FOXO regulation of the innate immunity transcription factor NF- $\kappa$ B/Relish in *Drosophila*, *Genetics*, **215**, 1013-1025, doi: 10.1534/genetics.120.303219.
85. Scott, B. A., Avidan M. S., and Crowder C. M. (2002) Regulation of hypoxic death in *C. elegans* by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2, *Science*, **296**, 2388-2391, doi: 10.1126/science.1072302.
86. Liu, X., Cai, X., Hu, B., Mei, Z., Zhang, D., et al. (2016) Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a) modulates hypoxia signaling via up-regulation of the von Hippel-Lindau gene (VHL), *J. Biol. Chem.*, **291**, 25692-25705, doi: 10.1074/jbc.M116.745471.
87. Samarin, J., Wessel, J., Cicha, I., Kroening, S., Warnecke, C., et al. (2010) FoxO proteins mediate hypoxic induction of connective tissue growth factor

- in endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 4328-4336, doi: 10.1074/jbc.M109.049650.
88. Xu, G. (2018) HIF-1-mediated expression of Foxo1 serves an important role in the proliferation and apoptosis of osteoblasts derived from children's iliac cancellous bone, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 6621-6631, doi: 10.3892/mmr.2018.8675.
89. Zheng, X., Zhai, B., Koivunen, P., Shin, S. J., Lu, G., et al. (2014) Prolyl hydroxylation by EglN2 destabilizes FOXO3a by blocking its interaction with the USP9x deubiquitinase, *Genes Dev.*, **28**, 1429-1444, doi: 10.1101/gad.242131.114.
90. Grabowska, W., Sikora, E., and Bielak-Zmijewska, A. (2017) Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process, *Biogerontology*, **4**, 447-476, doi: 10.1007/s10522-017-9685-9.
91. Ji, Z., Liu, G. H., and Qu, J. (2022) Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging, *J. Genet. Genomics*, **49**, 287-298, doi: 10.1016/j.jgg.2021.11.005.
92. Bhatt, V., and Tiwari, A. K. (2022) Sirtuins, a key regulator of ageing and age-related neurodegenerative diseases, *Int. J. Neurosci.*, **13**, 1-26, doi: 10.1080/00207454.2022.2057849.
93. Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Martin-Montalvo, A., et al. (2014) SIRT2104 extends survival of male mice on a standard diet and preserves bone and muscle mass, *Aging Cell*, **5**, 787-796, doi: 10.1111/ace.12220.
94. Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., et al. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase, *Science*, **303**, 2011-2015, doi: 10.1126/science.1094637.
95. Maillet, A., and Pervaiz, S. (2012) Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 1285-1294, doi: 10.1089/ars.2011.4434.
96. Ou, H.-L., and Schumacher, B. (2018) DNA damage responses and p53 in the aging process, *Blood*, **5**, 488-495, doi: 10.1182/blood-2017-07-746396.
97. Dioum, E. M., Chen, R., Alexander, M. S., Zhang, Q., Hogg, R. T., et al. (2009) Regulation of hypoxia-inducible factor 2 signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1, *Science*, **324**, 1289-1293, doi: 10.1126/science.1169956.
98. Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., et al. (2010) Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1, *Mol. Cell*, **38**, 864-878, doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.023.
99. Chen, R., Dioum, E. M., Hogg, R. T., Gerard, R. D., and Garcia, J. A. (2011) Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner, *J. Biol. Chem.*, **286**, 13869-13878, doi: 10.1074/jbc.M110.175414.
100. Laemmle, A., Lechleiter, A., Roh, V., Schwarz, C., Portmann, S., et al. (2012) Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 protein under hypoxic conditions, *PLoS One*, **7**, e33433, doi: 10.1371/journal.pone.0033433.
101. Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., et al. (2013) Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging, *Cell*, **155**, 1624-1638, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.037.
102. Joo, H.-Y., Yun, M., Jeong, J., Park, E.-R., Shin, H.-J., et al. (2015) SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) via direct interactions during hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **462**, 294-300, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.119.
103. Bai, M., Lu, C., An, L., Gao, Q., Xie, W., et al. (2020) SIRT1 Relieves Necrotizing Enterocolitis through Inactivation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$ , *Cell Cycle*, **19**, 2018-2027, doi: 10.1080/15384101.2020.1788251.
104. Lee, S. D., Kim, W., Jeong, J.-W., Park, J.-W., and Kim, J.-E. (2016) AK-1, a SIRT2 inhibitor, destabilizes HIF-1 and diminishes its transcriptional activity during hypoxia, *Cancer Lett.*, **373**, 138-145, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.031.
105. Seo, K.-S., Park, J.-H., Heo, J. Y., Jing, K., Han, J., et al. (2015) SIRT2 regulates tumour hypoxia response by promoting HIF-1 hydroxylation, *Oncogene*, **34**, 1354-1362, doi: 10.1038/onc.2014.76.
106. Geng, H., Liu, Q., Xue, C., David, L. L., Beer, T. M., et al. (2012) HIF1 protein stability is increased by acetylation at Lysine 709, *J. Biol. Chem.*, **287**, 35496-35505, doi: 10.1074/jbc.M112.400697.
107. Kaitsuka, T., Matsushita, M., and Matsushita, N. (2020) SIRT2 inhibition activates hypoxia-inducible factor 1 signaling and mediates neuronal survival, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **529**, 957-962, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.159.
108. Hu, A., Yang, L., Liang, J., Lu, D., Zhang, J., et al. (2020) SIRT2 modulates VEGFD-associated lymphangiogenesis by deacetylating EPAS1 in human head and neck, *Cancer. Mol. Carcinog.*, **59**, 1280-1291, doi: 10.1002/mc.23256.
109. Jing, E., Emanuelli B., Hirschey M.D., Boucher, J., Lee, K. Y., et al. (2011) Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **35**, 14608-14613, doi: 10.1073/pnas.1111308108.
110. Finley, L. W., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., et al. (2011) SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization, *Cancer Cell*, **19**, 416-428, doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.014.
111. Bell, E. L., Emerling, B. M., Ricoult, S. J., and Guarente, L. (2011) Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production, *Oncogene*, **30**, 2986-2996, doi: 10.1038/onc.2011.37.
112. Liu, B., Che, W., Xue, J., Zheng, C., Tang, K., et al. (2013) SIRT4 prevents hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells, *Cell. Physiol. Biochem.*, **32**, 655-662, doi: 10.1159/000354469.
113. Tong, Y., Kai, J., Wang, S., Yu, Y., Xie, S., et al. (2021) VHL regulates the sensitivity of clear cell renal cell carcinoma to SIRT4-mediated metabolic stress

- via HIF-1 $\alpha$ /HO-1 pathway, *Cell Death Dis.*, **12**, 621, doi: 10.1038/s41419-021-03901-7.
114. Yang, L., Ma, X., He, Y., Chen Yuan, C., Chen, Q., et al. (2017) Sirtuin 5: a review of structure, known inhibitors and clues for developing new inhibitors, *Sci. China. Life Sci.*, **3**, 249-256, doi: 10.1007/s11427-016-0060-7.
  115. D'Onofrio, N., Servillo, L., Giovane, A., Casale, R., Vitiello, M., et al. (2016) Ergothioneine oxidation in the protection against high-glucose induced endothelial senescence: Involvement of SIRT1 and SIRT6, *Free Radic. Biol. Med.*, **96**, 211-222, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.013.
  116. Wang, X.-X., Wang, X.-L., Tong, M., Gan, Lu, Chen, H., et al. (2016) SIRT6 protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by augmenting FoxO3 $\alpha$ -dependent antioxidant defense mechanisms, *Basic Res. Cardiol.*, **2**, 13, doi: 10.1007/s00395-016-0531-z.
  117. Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R. E., et al. (2010) The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 $\alpha$ , *Cell*, **140**, 280-293, doi: 10.1016/j.cell.2009.12.041.
  118. Yang, Z., Huang, Y., Zhu, L., Yang, K., Liang, K., et al. (2021) SIRT6 promotes angiogenesis and hemorrhage of carotid plaque via regulating HIF-1 $\alpha$  and reactive oxygen species, *Cell Death Dis.*, **12**, 77, doi: 10.1038/s41419-020-03372-2.
  119. Kiran, S., Anwar, T., Kiran, M., and Ramakrishna, G. (2015) Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: rise of the seventh sirtuin! *Cell. Signall.*, **3**, 673-682, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.11.026.
  120. Hubbi, M. E., Hu, H., Gilkes, D. M., and Semenza, G. L. (2013) Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20768-20775, doi: 10.1074/jbc.M113.476903.
  121. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203, doi: 10.1038/s41580-019-0199-y.
  122. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., et al. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint, *Mol. Cell*, **30**, 214-226, doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.
  123. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., et al. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex, *Genes Dev.*, **18**, 2893-2904, doi: 10.1101/gad.1256804.
  124. Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., et al. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity, *Nature*, **458**, 1056-1060, doi: 10.1038/nature07813.
  125. Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008) SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1: possible role in AMP-activated protein kinase activation, *J. Biol. Chem.*, **283**, 27628-27635, doi: 10.1074/jbc.M805711200.
  126. Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniari, J. M., Gygi, M. P., et al. (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **282**, 30107-30119, doi: 10.1074/jbc.M705325200.
  127. Sánchez-Álvarez, M., Strippoli, R., Donadelli, M., Bazhin, A. V., and Cordani, M. (2019) Sestrins as a therapeutic bridge between ROS and autophagy in cancer, *Cancers (Basel)*, **11**, 1415, doi: 10.3390/cancers11101415.
  128. Dzhililova, D. S., and Makarova, O. V. (2021) HIF-dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1163-1180, doi: 10.1134/S0006297921100011.
  129. Jung, S. N., Yang, W. K., Kim, J., Kim, H. S., Kim, E. J., et al. (2008) Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells, *Carcinogenesis*, **29**, 713-721, doi: 10.1093/carcin/bgn032.
  130. Abdel Malik, R., Zippel, N., Frömel, T., Heidler, J., Zukunft, S., et al. (2017) AMP-Activated Protein Kinase  $\alpha$ 2 in neutrophils regulates vascular repair via Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and a network of proteins affecting metabolism and apoptosis, *Circ. Res.*, **120**, 99-109, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309937.
  131. Treins, C., Murdaca, J., Van Obberghen, E., and GiorgettiPeraldi, S. (2006) AMPK activation inhibits the expression of HIF-1 $\alpha$  induced by insulin and IGF-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 1197-1202, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.088.
  132. Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., et al. (2013) AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*, *Cell Metab.*, **17**, 113-124, doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.001.
  133. Seo, K., Seo, S., Ki, S. H., and Shin, S. M. (2016) Sestrin2 inhibits hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  accumulation via AMPK-mediated prolyl hydroxylase regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, **101**, 511-523, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.014.
  134. Dengler, F. (2020) Activation of AMPK under hypoxia: many roads leading to Rome, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2428, doi: 10.3390/ijms21072428.
  135. Mulligan, J. D., Gonzalez, A. A., Kumar, R., Davis, A. J., and Saupe, K. W. (2005) Aging elevates basal adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activity and eliminates hypoxic activation of AMPK in mouse liver, *J. Gerontol.*, **60**, 21-27, doi: 10.1093/gerona/60.1.21.
  136. Arsham, A. M., Howell, J. J., and Simon, M. C. (2003) A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets, *J. Biol. Chem.*, **278**, 29655-29660, doi: 10.1074/jbc.M212770200.
  137. Chun, Y., and Kim, J. (2021) AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9765, doi: 10.3390/ijms22189765.



138. Kaper, F., Dornhoefer, N., and Giaccia, A. J. (2006) Mutations in the PI3K/PTEN/TSC2 pathway contribute to mammalian target of rapamycin activity and increased translation under hypoxic conditions, *Cancer Res.*, **66**, 1561-1569, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3375.
139. Ashok, B. S., Ajith, T. A., and Sivanesan, S. (2017) Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **44**, 327-334, doi: 10.1111/1440-1681.12717.
140. Tan, T., Marin-Garcia, J., Damle, S., and Weiss, H. R. (2010) Hypoxia Inducible Factor-1 improves inotropic responses of cardiac myocytes in aging heart without affecting mitochondrial activity, *Exp. Physiol.*, **95**, 712-722, doi: 10.1113/expphysiol.2009.051649.
141. Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C. X. (2008) Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease, *FEBS Lett.*, **582**, 359-364, doi: 10.1016/j.febslet.2007.12.035.
142. Ndubuizu, O. I., Chavez, J. C., and LaManna, J. C. (2009) Increased prolyl 4-hydroxylase expression and differential regulation of hypoxia-inducible factors in the aged rat brain, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **297**, R158-R165, doi: 10.1152/ajpregu.90829.2008.
143. Frenkel-Denkberg, G., Gershon, D., and Levy, A. P. (1999) The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice, *FEBS Lett.*, **462**, 341-344, doi: 10.1016/s0014-5793(99)01552-5.
144. Rohrbach, S., Teichert, S., Niemann, B., Franke, C., and Katschinski, D. (2008) Caloric restriction counteracts age-dependent changes in prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression, *Biogerontology*, **9**, 169-176, doi: 10.1007/s10522-008-9126-x.
145. Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., et al. (2000) Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity, *J. Biol. Chem.*, **275**, 29643-29674, doi: 10.1074/jbc.M001029200.
146. Kim, H. J., Jung, K. J., Yu, B. P., Cho, C. G., Choi, J. S., et al. (2002) Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging, *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 1589-1595, doi: 10.1016/s0047-6374(02)00094-5.
147. Kang, M. J., Kim, H. J., Kim, H. K., Lee, J. Y., Kim, D. H., et al. (2005) The effect of age and calorie restriction on HIF-1-responsive genes in aged liver, *Biogerontology*, **6**, 27-37, doi: 10.1007/s10522-004-7381-z.
148. Lee, S. J., Hwang, A. B., and Kenyon, C. (2010) Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity, *Curr. Biol.*, **20**, 2131-2136, doi: 10.1016/j.cub.2010.10.057.
149. Ebersole, J. L., Novak, M. J., Orraca, L., Martinez-Gonzalez, J., Kirakodu, S., et al. (2018) Hypoxia-inducible transcription factors, HIF1A and HIF2A, increase in aging mucosal tissues, *Immunology*, **154**, 452-464, doi: 10.1111/imm.12894.
150. Wang, H., Wu, H., Guo, H., Zhang, G., Zhang, R., and Zhan, S. (2012) Increased hypoxia-inducible factor 1alpha expression in rat brain tissues in response to aging, *Neural Regen Res.*, **7**, 778-782, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.10.010.
151. Tanaka, T., Kato, H., Kojima, I., Ohse, T., Son, D., et al. (2006) Hypoxia and expression of hypoxia-inducible factor in the aging kidney, *J. Gerontol. Med. Sci.*, **61**, 795-805, doi: 10.1093/gerona/61.8.795.
152. Leiser, S. F., and Kaerberlein, M. (2010) The hypoxia-inducible factor HIF-1 functions as both a positive and negative modulator of aging, *Biol. Chem.*, **391**, 1131-1137, doi: 10.1515/BC.2010.123.
153. Mehta, R., Steinkraus, K. A., Sutphin, G. L., Ramos, F. J., Shamieh, L. S., et al. (2009) Proteasomal regulation of the hypoxic response modulates aging in *C. elegans*, *Science*, **324**, 1196-1198, doi: 10.1126/science.1173507.
154. Kaerberlein, M., and Kapahi, P. (2009) The hypoxic response and aging, *Cell Cycle*, **8**, 2324, doi: 10.4161/cc.8.15.9126.
155. Jiang, H., Guo, R., and Powell-Coffman, J. A. (2001) The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7916-7921, doi: 10.1073/pnas.141234698.
156. Chen, D., Thomas, E. L., and Kapahi, P. (2009) HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS Genet.*, **5**, e1000486, doi: 10.1371/journal.pgen.1000486.
157. Zhang, Y., Shao, Z., Zhai, Z., Shen, C., and Powell-Coffman, J. A. (2009) The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*, *PLoS One*, **4**, e6348, doi: 10.1371/journal.pone.0006348.
158. Bellier, A., Chen, C.-S., Kao, C.-Y., Cinar, H. N., Aroian, R. V. (2009) Hypoxia and the hypoxic response pathway protect against pore-forming Toxins in *C. elegans*, *PLoS Pathog.*, **5**, e1000689, doi: 10.1371/journal.ppat.1000689.
159. Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Wesley, J., Sarkar, K., Kimura, H., et al. (2007) Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia, *Circ. Res.*, **101**, 1310-1318, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153346.
160. Cheng, X., Kuzuya, M., Kim, W., Song, H., Hu, L., et al. (2010) Exercise training stimulates ischemia-induced neovascularization via phosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent hypoxia-induced factor-1 alpha reactivation in mice of advanced age, *Circulation*, **122**, 707-716, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909218.

## THE ROLE OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR IN THE MECHANISMS OF AGING

### Review

D. Sh. Dzhaliylova<sup>1\*</sup> and O. V. Makarova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, 117418 Moscow, Russia; e-mail: juliajal93@mail.ru*

<sup>2</sup> *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Aging is accompanied by a reduction in the oxygen delivery to all organs and tissues and decrease in the oxygen partial pressure in them, resulting in the development of hypoxia. The lack of oxygen activates cell signaling pathway mediated by the hypoxia-inducible transcription factor (HIF), which exists in three isoforms – HIF-1, HIF-2, and HIF-3. HIF regulates expression of several thousand genes and is a potential target for the development of new drugs for the treatment of many diseases, including those associated with age. Human organism and organisms of laboratory animals differ in their tolerance to hypoxia and expression of HIF and HIF-dependent genes, which may contribute to the development of inflammatory, tumor, and cardiovascular diseases. Currently, the data on changes in the HIF expression with age are contradictory, which is mostly due to the fact that such studies are conducted in different age groups, cell types, and model organisms, as well as under different hypoxic conditions and mainly *in vitro*. Furthermore, the observed discrepancies can be due to the individual tolerance of the studied organisms to hypoxia, which is typically not taken into account. Therefore, the purpose of this review was to analyze the published data on the connection between the mechanisms of aging, basal tolerance to hypoxia, and changes in the level of HIF expression with age. Here, we summarized the data on the age-related changes in the hypoxia tolerance, HIF expression and the role of HIF in aging, which is associated with its involvement in the molecular pathways mediated by insulin and IGF-1 (IIS), sirtuins (SIRT5), and mTOR. HIF-1 interacts with many components of the IIS pathway, in particular with FOXO, the activation of which reduces production of reactive oxygen species (ROS) and increases hypoxia tolerance. Under hypoxic conditions, FOXO is activated via both HIF-dependent and HIF-independent pathways, which contributes to a decrease in the ROS levels. The activity of HIF-1 is regulated by all members of the sirtuin family, except SIRT5, while the mechanisms of SIRT interaction with HIF-2 and HIF-3 are poorly understood. The connection between HIF and mTOR and its inhibitor, AMPK, has been identified, but its exact mechanism has yet to be studied. Understanding the role of HIF and hypoxia in aging and pathogenesis of age-associated diseases is essential for the development of new approaches to the personalized therapy of these diseases, and requires further research.

*Keywords:* hypoxia tolerance, mechanisms of aging, HIF, age

## СЕГРЕГАЦИЯ КЛАСТЕРОВ $\alpha$ - И $\beta$ -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ ПОЗВОНОЧНЫХ – СЛУЧАЙНОСТЬ ИЛИ ЗАКОНОМЕРНОСТЬ?

### Обзор

© 2022 О.В. Яровая<sup>1\*</sup>, С.В. Ульянов<sup>1,2</sup>, Е.С. Юдинкова<sup>1</sup>, С.В. Разин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН,  
119334 Москва, Россия; электронная почта: iarovaia@inbox.ru  
<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.07.2022  
После доработки 18.08.2022  
Принята к публикации 19.08.2022

Обзор посвящен закономерностям эволюции доменов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов. Впервые представлена гипотеза, в соответствии с которой сегрегация предкового кластера  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов Amniota закономерна и обусловлена выполнением  $\alpha$ -глобинами и  $\beta$ -глобинами неканонических функций, не связанных с транспортом кислорода.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эволюция  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов, регуляция транскрипции, неканонические функции  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090093, **EDN:** BBEVGH

### ВВЕДЕНИЕ

У позвоночных животных транспорт кислорода от органов дыхания к потребляющим кислород тканям обеспечивается гемоглобином. Молекула гемоглобина состоит из двух полипептидных цепей  $\alpha$ -типа и двух полипептидных цепей  $\beta$ -типа, каждая из которых связана с протетической группой – железосодержащим гемом. Гены, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобины теплокровных, – классический модельный объект молекулярной биологии. Структура кластеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов, механизмы регуляции их транскрипции в эритроидных клетках и эволюция изучены очень основательно [1–8]. Структура молекулы гемоглобина предполагает необходимость эквимоллярной экспрессии

Принятые сокращения: CTC – циркулирующие опухолевые клетки; KLF1 и KLF4 – транскрипционные факторы, регулирующие транскрипцию  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов; LCR – область контроля локуса, эритроид-специфичный суперэнхансер; MRE – главный регуляторный элемент локуса  $\alpha$ -глобиновых генов, эритроид-специфичный энхансер; RIG-1 – рецептор распознавания патогенов; RNS – активные формы азота; ROS – активные формы кислорода.

\* Адресат для корреспонденции.

$\alpha$ -глобиновых и  $\beta$ -глобиновых генов с тем, чтобы в эритроцитах количество  $\alpha$ -глобиновых цепей и  $\beta$ -глобиновых цепей было примерно одинаковым. Избыток  $\alpha$ - или  $\beta$ -глобиновых цепей, ассоциированный с генетическими заболеваниями, приводит к образованию нестабильных полипептидных агрегатов из избыточных белков, нарушающих нормальное функционирование эритроцитов, их разрушению и анемии [9–11]. Представляется очевидным, что проще всего координированная сбалансированная эквимоллярная экспрессия достигается, когда  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены соседствуют в составе единого локуса, транскрибируются с общего промотора и/или используют общий энхансер. Именно такую структуру, вероятнее всего, имел предковый локус, в котором  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены, предположительно, локализовались в непосредственной близости друг от друга и находились в составе общего регуляторного домена [12].

Предковые  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены произошли в результате дупликации прото-глобинового гена у общего предка челюстноротых и сохранили соседство после дивергенции. Тесное соседство  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и ко-



ординированная экспрессия в составе общего кластера сохранились в геномах современных рыб и земноводных. Однако, наряду со слитым доменом  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов, у некоторых групп земноводных в геноме присутствуют сегрегированные глобиновые гены. У рептилий, птиц и плацентарных млекопитающих  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены сегрегированы полностью и располагаются на разных хромосомах. Транспозиция предкового гена  $\beta$ -глобина разрушила стройную и простую систему, обеспечивающую координированную экспрессию  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов, и обусловила появление независимых систем регуляции транскрипции доменов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов. На первый взгляд, событие сегрегации, разрушающее сложившийся регуляторный контекст, контрпродуктивно, биологического смысла не имеет и не должно было закрепиться в эволюции. Представляется очевидным, что отбор должен быть направлен в сторону сохранения соседства и общих регуляторных механизмов для генов, кодирующих субъединицы одного белка. Однако давление естественного отбора в направлении сегрегации очевидно обеспечивало возможные эволюционные преимущества, окупающие «потери», сопровождающие разрушение регуляторного контекста предкового кластера  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов. Результатом сегрегации предкового кластера могла стать возможность независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в незэритроидных тканях. Можно осторожно предположить, что первые попытки сегрегации  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов совпали по времени с выходом на сушу общего предка Tetrapoda и окончательно закрепились в геномах Amniota вследствие полной утраты связи с водной средой обитания.

Выход на сушу был огромным эволюционным скачком. Изменение среды обитания потребовало решения многих, возникших в связи с этим, проблем развития новых физиологических функций, систем органов и адаптивных механизмов. Возможно, приобретение новых функций у общего предка наземных животных сопровождалось «плейотропизацией» генов и кодируемых ими полипептидов, причем не только регуляторных и сигнальных, но и части структурных белков; и именно в этом направлении шел отбор. Мы предполагаем, что независимо экспрессирующиеся  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобины у первых обитателей суши были приспособлены для выполнения неких особых функций, возможно, ассоциированных с решением проблем, возникших в связи с расширением среды обитания и прямо не связанных с эритроцитарным транспортом кислорода. Именно это сделало

не только возможным, но и необходимым сегрегацию  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и их независимую экспрессию. Можно предположить, что потери в результате произошедшей сегрегации оказались не очень существенными. Коррекция изолированных  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в эритроидных клетках — по всей видимости, задача легко разрешимая в силу того, что уровень экспрессии глобиновых генов выведен на максимальное значение, и весь метаболический потенциал эритробласта используется для достижения одной цели — синтеза максимально возможного количества гемоглобина. Возможные приобретения, возникшие после сегрегации, очень значительны. Одним из таких приобретений является возможность независимого участия только  $\alpha$ - или только  $\beta$ -глобинов в формировании надмолекулярных комплексов, отличных от гемоглобина. Тогда сегрегация генов неслучайна, имеет биологический смысл и должна закрепиться в эволюции.

Гипотеза о закономерном характере сегрегации  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в ходе эволюции позвоночных представлена в научной литературе впервые.

### **ЭВОЛЮЦИЯ ГЛОБИНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИХ ГЕНОВ И РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ**

По общему мнению, глобиновые гены появились в геноме эукариот одновременно с митохондриями и пластидами в результате переноса генов, а возможно, и поглощения или слияния геномов. Вероятнее всего, функциями предковых глобинов были ферментативная, сигнальная и защитная [13], так как для древних анаэробных организмов кислород, вероятнее всего, был токсичен. Анализ экзон-интронной структуры глобинов позволяет утверждать, что почти все эукариотические глобины произошли от одного предка. Весь репертуар глобиновых генов современных позвоночных обязан своим появлением нескольким циклам полногеномных дупликаций и ряду сегментных дупликаций в ходе эволюции с последующей суб- и неофункционализацией. Полногеномные дупликации предоставили широкие возможности для быстрой специализации дочерних форм и функциональной диверсификации белков, кодируемых паралогичными генами.

В геномах современных позвоночных присутствует несколько групп глобиновых генов, кодирующих нейроглобин (Ngb), цитоглобин (Cygb), андроглобин (Adgb), гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb), а также менее распространенные глобины X, Y и E (GbX, GbY

и GbE) [14–16]. Основными функциями этих глобинов являются запасание кислорода в тканях, а также защита от оксидативного стресса. В результате двух раундов полногеномных дупликаций и последующей неофункционализации появились глобины, приспособленные к запасанию кислорода в клетках разного типа (Mb, Cygb, GbE) [17]. Далее в ходе эволюции возникла возможность физиологического разделения труда между функциями запасания и транспорта кислорода; появились предшественники  $\alpha$ -глобинов и  $\beta$ -глобинов челюстноротых и гемоглобины бесчелюстных [18], приспособленные к транспорту кислорода от органов дыхания к тканям, что дало неоценимые эволюционные преимущества позвоночным животным [19]. Уникальная способность гемоглобина транспортировать кислород из органов дыхания по всему организму обусловлена его способностью эффективно захватывать кислород в легких или жабрах и легко высвобождать в тканях. Оптимизация транспортных функций требовала усложнения молекулы-транспортера кислорода. Современный гемоглобин обязан своим появлением несколькими событиями: дупликации прото-глобинового гена, точечным мутациям в составе дочерних паралогов и дальнейшей дифференцировке  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов [19]. Дупликация прото-глобинового гена произошла 450–500 млн лет назад у общего предка современных позвоночных [19, 20]. С использованием статистических и биохимических методов для реконструкции и экспериментальной характеристики древних белков были восстановлены мутации, которые привели к появлению около 400 млн лет назад тетрамерного гемоглобина. Всего две постдупликационные замены на поверхности глобулы реконструированного предкового глобина привели к появлению глобинов  $\alpha$ -типа и  $\beta$ -типа и обеспечили возможность его тетрамеризации [21]. Появление сложной тетрамерной структуры гемоглобина современных позвоночных сделало возможным кооперативное связывание и высвобождение кислорода, а также аллостерическую регуляцию этого процесса, невозможную у древних мономерных или гомодимерных транспортеров кислорода [22].

Сравнение организации, геномной локализации и механизмов регуляции экспрессии глобиновых генов у филогенетически удаленных организмов может предоставить важные данные о закономерностях их эволюции, в том числе о механизмах и последствиях сегрегации  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых доменов. Предполагается, что геномный контекст и структура постдупликационного предкового локуса схожа со струк-

турой главного локуса  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов современных рыб. В составе домена присутствуют как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -глобиновые гены [23]. Ближайшее эволюционно консервативное окружение слитого домена обеспечивает регуляторный контекст, который остается актуальным на протяжении всей эволюционной истории позвоночных и сохраняется в геноме Tetrapoda (рис. 1). С одной стороны, локус фланкирован тремя генами домашнего хозяйства (*RHBDF*, *MPG* и *NPRL3*), и в одном из этих генов (*NPRL3*) расположен эритроид-специфичный энхансер (который у млекопитающих обладает характерными чертами суперэнхансера), контролирующей транскрипцию глобиновых генов. Необходимо отметить, что в ходе эволюции костистых рыб произошла телеост-специфическая полногеномная дупликация. В результате локус  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов дублировался, и в геномах современных костистых рыб чередующиеся  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены располагаются на двух хромосомах в главном и минорном локусах. Минорный локус глобиновых генов синтенен главному, однако из трех фланкирующих генов домашнего хозяйства в нем присутствует только один – *RHBDF*. В минорном локусе *Danio rerio* картирован эритроид-специфичный энхансер, но его происхождение и эволюционные взаимоотношения с энхансером главного локуса остаются невыясненными [24].

Характерное для рыб соседство и геномный контекст  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в составе единого кластера отчасти сохраняется и у земноводных (рис. 1) [25–27]. Предполагается, что у общего предка амфибий предковый локус имел следующую конфигурацию: 5'-*RHBDF1-MPG1-NPRL3- $\alpha E$ - $\alpha A$ - $\beta T$ - $\beta A$ -GbY-LUC7L-3'*. Ген *GBY* присутствует в геномах современных костистых рыб, шпорцевой лягушки, некоторых пресмыкающихся и утконоса [28, 29]. Его физиологическая роль на настоящий момент изучена мало. В ходе эволюции земноводных синтения в левой части кластера сохранилась, противоположный конец подвергся перестройкам, в результате чего возникли два локуса. Один локус содержал и  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены (5'-*NPRL3- $\alpha E$ - $\alpha A$ - $\beta T$ -3'*), а другой – ген(ы)  $\beta$ -глобина и ген глобина Y, *GBY* (5'-*LUC7L-GbY- $\beta A$ -3'*). Таким образом, в результате перестройки предкового локуса у нескольких групп земноводных появляется сегрегированный ген  $\beta$ -глобина, причем у некоторых систематических групп слитый  $\alpha/\beta$ -глобиновый домен и сегрегированный ген  $\beta$ -глобина располагаются на разных хромосомах. Анализ геномного окружения этого сегрегированного  $\beta$ -глобина



позволяет предположить, что события транспозиции части кластера происходили в эволюции несколько раз и независимо у разных таксономических групп земноводных. Было бы очень заманчиво предположить, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены в составе сегрегированных кластеров дифференциально экспрессируются на разных стадиях индивидуального развития и именно сегрегация обеспечила их независимую стадиеспецифическую экспрессию, однако систематические данные о стадиеспецифическом характере экспрессии  $\beta$ -глобиновых генов в составе слитого или сегрегированного локуса у земноводных отсутствуют.

У общего предка Amniota происходит важное событие, существенно изменившее геномный контекст и механизмы регуляции  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов – окончательная сегрегация  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов. Если у рыб и земноводных по крайней мере часть  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов колокализированы в едином кластере, то у подавляющего большинства современных рептилий, птиц и млекопитающих  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены располагаются на разных хромосомах [4].

Геномное окружение  $\alpha$ -глобиновых генов эволюционно очень консервативно. Практически у всех птиц и млекопитающих сохраняется соседство кластера глобиновых генов с генами *NPRL3*, *MPG1* и *RHBDF1*, характерное для главного локуса глобиновых генов рыб [30]. В геномах завропсид произошла инверсия на 3'-конце локуса [4], благодаря чему ген *TMEM8* оказался сближен с глобиновыми генами и, по крайней мере у птиц, вовлечен в регуляторную сеть глобиновых генов и приобрел эритроид-специфичный характер экспрессии [31, 32]. Гены *MPG1* и *RHBDF1* у пресмыкающихся не являются обязательной частью синтении, однако, возможно, их отсутствие связано с недостатками картирования.

Древняя ассоциация  $\alpha$ -глобиновых генов и родственного  $\beta$ -глобину орфанного  $\omega$ -глобинового гена в составе общего кластера – своеобразный генетический атавизм – сохраняется только у однопроходных и сумчатых млекопитающих (рис. 1) [29, 33–35]. У Amniota после окончательной сегрегации локусы  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов оказались на разных хромосомах. В геномах млекопитающих и у части пресмыкающихся  $\beta$ -глобиновые гены находятся в окружении или фланкированы многочисленными генами одорантных рецепторов, которые экспрессируются в обонятельных нейронах [36]. Сегрегация  $\beta$ -глобиновых генов могла произойти в результате дупликации [35] или транспозиции целого предкового домена и последующей

утраты  $\alpha$ -глобиновых генов или в результате транспозиции  $\beta$ -глобинового гена с соседствующим регуляторным элементом или только  $\beta$ -глобиновых генов на другую хромосому [29]. В результате этой перестройки была разрушена связь глобиновых генов с геном *NPRL3*, в составе которого находится энхансер глобиновых генов рыб и, предположительно, земноводных. Новое геномное окружение потребовало появления нового регуляторного контекста, в том числе новых регуляторных элементов.

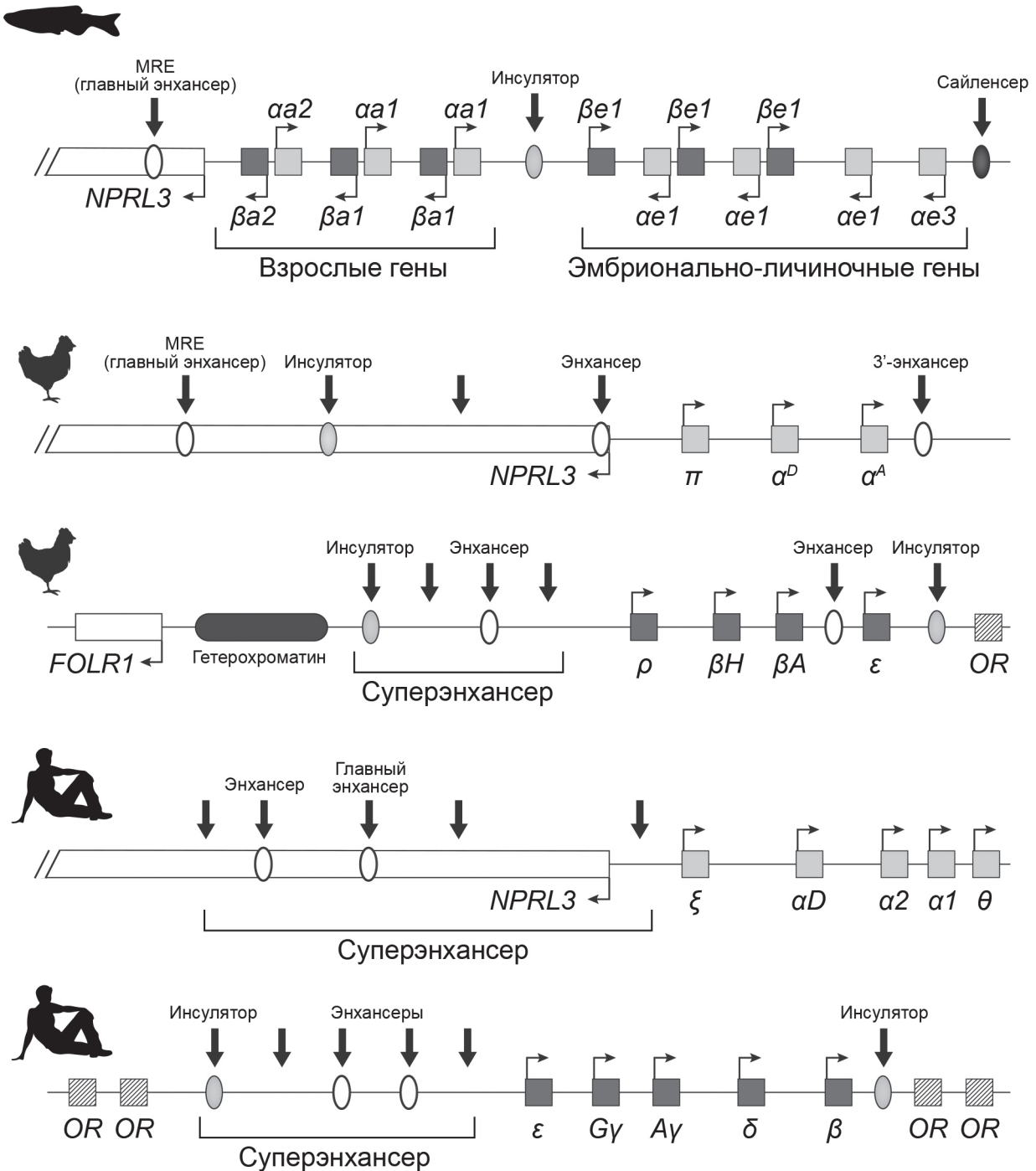
### ОРГАНИЗАЦИЯ СЛИТЫХ И СЕГРЕГИРОВАННЫХ ЛОКУСОВ $\alpha/\beta$ -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ У СОВРЕМЕННЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Анализ особенностей организации и механизмов регуляции экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов посвящено огромное количество экспериментальных статей и обзоров [2, 8, 37]. Поэтому мы остановимся на этом вопросе очень кратко. У костистых рыб  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены расположены в двух синтенных кластерах, расположенных на разных хромосомах, в главном и минорном локусах, которые являются продуктами полногеномной телеост-специфической дупликации [23]. В главном локусе глобиновых генов *Danio rerio* (который близок по своей структуре к предковому) располагаются 13  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов, транскрибирующихся в противоположных направлениях (рис. 2). Локус разделен на два стадиеспецифичных субдомена, содержащих гены, транскрибирующиеся на взрослой и эмбрионально-личиночной стадиях развития. Взрослые гены находятся под контролем общего удаленного эритроид-специфичного энхансера (MRE), который расположен во фланкирующем кластер гена *NPRL3*. Эмбрионально-личиночные гены, предположительно, общего энхансера не имеют. Репрессия эмбрионально-личиночных генов во взрослых эритроцитах, вероятнее всего, обеспечивается сайленсером, расположенным в конце кластера. Стадиеспецифические субдомены разделены CTCF-зависимым инсулятором, обеспечивающим изоляцию эмбрионально-личиночных генов от энхансера MRE, направляющего экспрессию генов взрослого субдомена [38]. В результате сегрегации и транспозиции всего предкового локуса или его части и последующей независимой эволюции в синтенном предковом кластере остались исключительно  $\alpha$ -глобиновые гены,  $\beta$ -глобиновые гены переместились у общего предка Amniota на другую хромосому. Локус  $\alpha$ -глобиновых генов теплокровных



содержит несколько генов, которые являются продуктами дупликаций и кодируют разные изоформы  $\alpha$ -глобина, в том числе экспрессирующиеся на разных стадиях онтогенеза. Главный эритроид-специфичный энхансер и у птиц, и у млекопитающих, так же, как и у рыб, находится в интроне гена *NPRL3*. У человека и мыши вместе с дополнительным энхансером, который также расположен в интроне *NPRL3*, MRE вхо-

дит в состав протяженного суперэнхансера [39]. Регуляторная оснастка домена  $\alpha$ -глобиновых генов птиц устроена несколько более сложно. Помимо MRE, в регуляции транскрипции  $\alpha$ -глобиновых генов *Gallus gallus* принимают участие два дополнительных энхансера, один из которых фланкирует локус и, предположительно, обеспечивает экспрессию эмбрионального  $\alpha$ -глобинового гена [40]. Помимо этого,



**Рис. 2.** Организация кластеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и их регуляторных элементов у разных видов позвоночных. Черными стрелками обозначены участки, гиперчувствительные к ДНКазе I, овалами – регуляторные элементы, прямоугольниками – транскрипционные единицы

в регуляторную сеть эритроид-специфических регуляторных элементов оказался вовлечен эритроидный энхансер гена *TMEM8*, который фланкирует домен с 3'-конца и очутился там в результате инверсии небольшого участка, специфичной для завропсид [31, 32]. Таким образом, регуляторный контекст главного локуса  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов рыб и локусов  $\alpha$ -глобиновых генов теплокровных, различаясь в ассортименте регуляторных элементов, остается в части наличия главного энхансера (MRE) очень консервативным на протяжении всей эволюции позвоночных. Более того, MRE-подобный энхансер, расположенный в одном из интронов *NPRL3*, картирован в локусе глобиновых генов круглоротых [18]. Глобиновые гены круглоротых паралогичны  $\alpha/\beta$ -глобиновым генам челюстноротых, но эволюционно гораздо ближе гену цитоглобина и, скорее всего, являются продуктом эволюции общего предка генов цитоглобина,  $\alpha$ -глобина и  $\beta$ -глобина. Таким образом, регуляторный контекст глобиновых генов мог сформироваться раньше дивергенции цитоглобина и гемоглобина, что выглядит достаточно парадоксально.

После транспозиции на другую хромосому домен  $\beta$ -глобиновых генов оказался фланкирован (у завропсид) или окружен генами обонятельных рецепторов (у млекопитающих) [12, 36, 41]. У современных Tetrapoda в составе домена присутствуют несколько  $\beta$ -глобиновых генов, кодирующих разные, в том числе стадийспецифические, изоформы гемоглобина. Локус находится под контролем сложного, протяженного удаленного регуляторного элемента (LCR) [42–44]. В состав LCR входят энхансеры, сайленсеры, инсулятор и регуляторы хроматинового статуса и времени репликации  $\beta$ -глобиновых генов. У птиц, по сравнению с млекопитающими, в дополнение к LCR картирован еще один энхансер, расположенный между глобиновыми генами [45]. Важным эволюционным приобретением в ассортименте регуляторных элементов  $\beta$ -глобиновых генов после транспозиции явились инсуляторы, изолирующие домен эритроид-специфических  $\beta$ -глобиновых генов от нейрональных генов одорантных рецепторов [6, 46–48]. Именно изоляция, присутствие инсуляторов на границах домена, определяет границы хроматиновых доменов и позволяет защитить соседствующие гены от «чужих» энхансеров. И в случае  $\alpha$ -, и в случае  $\beta$ -глобиновых генов важным этапом их активации в эритроблестах является сближение в пространстве ядра и формирование контактов между кодирующими единицами и удаленными регуляторными элементами доменов [49–51].

Сегрегация  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов у общего предка Amniota сопровождалась появлением и быстрой эволюцией нового сложно устроенного многофункционального регуляторного элемента – LCR. Присутствие инсулятора в составе LCR можно объяснить наличием некоего прото-инсулятора в составе транслоцированной на другую хромосому части домена либо «удачным приземлением» транслоцированного сегмента в область, уже защищенную инсуляторами. Последнее маловероятно; при любых обстоятельствах при отсутствии такого изолирующего элемента трудно себе представить механизмы сохранения эритроид-специфического характера экспрессии  $\beta$ -глобина в новой геномной локации и в окружении нейрональных генов. Предположительно, предковый  $\alpha/\beta$ -глобиновый домен уже был сегрегирован на два или несколько структурно и функционально независимых субдомена (такое устройство кластера и даже присутствие CTCF-зависимого инсулятора мы видим в главном локусе глобиновых генов *Danio rerio* [38]). Вероятнее всего, похожая сегрегация предкового локуса могла быть обусловлена экспрессией дивергировавших изоформ гемоглобина (например, приспособленных к дыханию в водной среде и на суше). Однако достаточных материалов для анализа этого вопроса с использованием современных экспериментальных моделей нет. Закljučая, необходимо еще раз отметить, что сегрегация и транспозиция части предкового домена на другую хромосому сопровождалась формированием нового, независимого от предкового, регуляторного контекста перемещенного локуса. В то же время регуляция транскрипции  $\alpha$ -глобиновых генов, синтенных предковому домену, сохранила эволюционно древние особенности, вероятно, присущие общему предку челюстноротых и бесчелюстных позвоночных [18].

Филогенетический анализ и анализ синтений локусов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов у разных таксономических групп позволяет с осторожностью заключить, что сегрегация общего  $\alpha/\beta$ -глобинового предкового локуса коррелировала с освоением суши общими предками Tetrapoda и окончательным разрывом с водной средой обитания у общего предка Amniota. Изменение среды обитания сопровождалось, прежде всего, изменениями в физиологии дыхания – от жаберного дыхания у рыб к смешанному легочному и кожному дыханию у земноводных и легочному дыханию у Amniota. Мы предполагаем, что приобретение новых функций у общего предка наземных животных, в том числе принципиальные изменения

в физиологии дыхания, сопровождалось «плейотропизацией»  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов и участием их в формировании альтернативных гемоглобину надмолекулярных комплексов в неэритроидных клетках. Это, в свою очередь, повлекло за собой необходимость независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и формирования независимых регуляторных механизмов. Именно поэтому отбор мог быть направлен в сторону сегрегации доменов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и их регуляторных сетей.

### ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В НЕЭРИТРОИДНЫХ ТКАНЯХ

Есть ли какие-то основания полагать, что у современных амниот возможность независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов действительно реализуется? Независимая экспрессия имеет явный биологический смысл в неэритроидных тканях и, возможно, независимо экспрессирующиеся  $\alpha$ - или  $\beta$ -глобины действительно выполняют некие важные функции, отличные от транспортировки кислорода. В этом случае промежуточным логическим звеном является принципиальная возможность экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов в неэритроидных тканях. Действительно, не так давно феномен неэритроидной экспрессии глобинов был обнаружен как на транскрипционном уровне, так и на уровне синтеза белка. При этом синтез гемоглобина в неэритроидных клетках имеет неожиданно распространенный характер, что и отражено в литературных обзорах [14, 15, 52]. В целом ряде случаев гемоглобин неэритроидных клеток обеспечивает запасание кислорода в клетке и тем самым отчасти дублирует функции миоглобина и цитоглобина. Такое дублирование особенно актуально для клеток, имеющих высокую чувствительность к гипоксии или резко увеличенную потребность в кислороде: в нейронах разного типа, в клетках эндометрия, пигментных клетках сетчатки [53–59]. Неэритроцитарный гемоглобин способен удерживать и секвестрировать кислород в тканях, для которых нормой являются высокогипоксические условия. Так, удержание кислорода гемоглобином в хрусталике имеет протективную роль, т.к. избыток кислорода в хрусталике опасен с точки зрения возможного окисления белков и продукции активных форм кислорода (ROS) [60, 61].

Неэритроцитарный гемоглобин может обеспечивать целый ряд функций, никак не связанных с удержанием, запасанием или транспортом кислорода. Связывание и диссоциация

кислорода и углекислого газа гемоглобином не сопровождаются изменением степени окисления железа. Однако при определенных условиях железо в составе гемоглобина может окисляться или восстанавливаться, и это свойство обеспечивает возможность участия гемоглобина в метаболизме NO и H<sub>2</sub>S, детоксикации ROS и активных форм азота (RNS), обеспечении сенсорных функций и участия в передаче сигнала [62]. Приобретая возможность эффективного транспорта кислорода, современный гемоглобин позвоночных сохранил эволюционно более древние функции глобинов. Так, гем-Fe(II)-O<sub>2</sub> способен реагировать с пероксинитритом с образованием нитрата и Fe(III). Гем обладает пероксидазной активностью, причем способность гемоглобина утилизировать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> даже выше, чем у ферментативной системы глутатионпероксидазы/глутатионредуктазы [63–65]. В целом ряде оригинальных исследований была продемонстрирована важная роль гемоглобина не только в запасании кислорода, но и в антиоксидантной защите неэритроидных клеток, в том числе нейронов, клеток мезангиального эпителия и гепатоцитов [66–68]. Не исключено, что гемоглобин выполняет роль сенсора энергетического статуса нейронов и даже принимает участие в регуляции биогенеза рибосом, аутофагии и эпигенетической регуляции экспрессии [69, 70]. Гемоглобин может играть важную роль в митохондриальном дыхании, предположительно, взаимодействуя с компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий, участвуя в регуляции окислительно-восстановительных реакций и защите митохондриальных белков от оксидативного и нитрозативного стресса [58, 71, 72].

В альвеолярных клетках Hb не только обеспечивает пограничный транспорт кислорода между воздушной средой и кровью, но и выполняет роль сенсора содержания кислорода и скавенджера ROS и RNS при окислительном и нитрозативном стрессе [73, 74]. В условиях гипоксии уровень экспрессии HIF-2 $\alpha$  (транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией) увеличивается, что, в свою очередь вызывает одновременное увеличение синтеза гемоглобина и уменьшение синтеза про-сурфактантных белков в альвеолярных клетках. Это обеспечивает поддержание гомеостаза легочного эпителия и защиту его от повреждения и отека в условиях гипоксии [75].

Гемоглобин экспрессируется в целом ряде раковых клеток [76–79], предположительно, обеспечивая их устойчивость к оксидативному стрессу, в том числе в ходе химиотерапии.

Свободный гемоглобин и гемоцидины (биологически активные продукты протеолиза Hb) являются сильными антибактериальными агентами. Экспрессия гемоглобина в вагинальном и цервикальном эпителии [79–81] обеспечивает защиту клеток от бактериальной инфекции и воспаления. Продемонстрирована важная роль гемоглобина и гемоцидинов в модуляции иммунного ответа [82]. Лизис эритроцитов, ассоциированный с травмами и рядом инфекций, ведет к появлению свободного гемоглобина в плазме крови. Взаимодействуя с патоген-ассоциированными молекулами, Toll-подобными рецепторами, белками теплового шока, гемоглобин стимулирует проинфламаторную экспрессию цитокинов [83–85] и таким образом выполняет сигнальную функцию.

### НЕЗАВИСИМАЯ ЭКСПРЕССИЯ $\alpha$ - И $\beta$ -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ

Обнаружение экспрессии гемоглобина в неэритроидных клетках позволило предположить, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобины могут использоваться для выполнения неканонических функций как в виде мономерных белков, так и в составе негемоглобиновых надмолекулярных комплексов. Независимая экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов тем более облегчается их сегрегацией на разных хромосомах у Amniota, использованием независимых механизмов регуляции транскрипции и вследствие этого возможностью их независимой активации и репрессии. Хочется еще раз подчеркнуть, что давление отбора в направлении закрепления сегрегации может быть обусловлено именно возможностью и необходимостью независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов в связи с выполнением  $\alpha$ -глобином и  $\beta$ -глобином самых неожиданных функций, не связанных с транспортом, запасанием или удержанием кислорода. Обнаружение независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов у современных позвоночных существенно расширило наши представления о спектре неканонических функций  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов.

Было обнаружено, что  $\beta$ -глобин является мощным противовирусным агентом, причем его противовирусное действие реализуется с привлечением нескольких независимых механизмов. При инфекции свиней флавивирусом  $\beta$ -глобин связывает капсидный белок и ингибирует репликацию вирусной РНК, что уменьшает инфекционность вируса [86]. Кроме того,  $\beta$ -глобин индуцирует синтез интерферона по RIG-зависимому сигнальному пути, т.е. в данном случае  $\beta$ -глобин выступает в качестве одно-

го из факторов врожденного противовирусного иммунитета. Также  $\beta$ -глобин индуцирует продукцию ROS, что вызывает убиквитинирование RIG-1 и усиление противовирусного ответа [82, 87]. Таким образом, в ходе вирусной инфекции  $\beta$ -глобин функционирует независимо от  $\alpha$ -глобина в качестве плейотропного противовирусного агента и регулятора иммунного ответа.

Независимая экспрессия  $\alpha$ -глобина как на уровне РНК, так и на уровне белка обнаруживается в синцитиотрофобластах и стромах плаценты в условиях гипоксии, а также при преэклампсии – патологическом состоянии, ассоциированном с дисфункцией плаценты [88]. Выполняет ли  $\alpha$ -глобин защитную функцию или, напротив, является патологическим фактором, остается неясным. Накопление  $\beta$ -глобина было обнаружено в митохондриях нейронов больных рассеянным склерозом [69, 89]. Возможно, накопление  $\beta$ -глобина является протективным механизмом, защищающим нейроны от гибели, а не пассивным следствием патологического процесса.

Продукция минорной формы  $\beta$ -глобина была обнаружена в мышечных макрофагах, обработанных липополисахаридом и интерфероном (т.е. в условиях, моделирующих активацию лимфоцитов при встрече с патогеном) [90]. Высокий уровень продукции RNS и ROS активированными макрофагами является важной составляющей их бактерицидного действия и сопровождается индукцией NO-синтазы, NADPH-оксидазы и ингибированием клеточного дыхания. Не исключено, что мономерный  $\beta$ -глобин функционирует в качестве сенсора содержания NO и O<sub>2</sub> и запускает механизмы защиты макрофагов от оксидативного стресса, при этом не участвуя прямо в метаболизме NO. Интересно, что индукции экспрессии *Hbb-b1* в этих условиях не происходит. Возможно, избирательная индукция объясняется наличием разного количества сайтов связывания одного из активаторов транскрипции  $\beta$ -глобиновых генов – KLF1. В регуляторных последовательностях *Hbb-b1* присутствуют три таких сайта, против одного – в *Hbb-b2*.

Экспрессия  $\beta$ -глобина, но не  $\alpha$ -глобина, была обнаружена в циркулирующих опухолевых клетках (СТС) [91]. Механизмы выживания СТС в кровотоке в условиях постоянного оксидативного стресса изучены плохо. В модельной системе индукция ROS в культивируемых СТС сопровождалась KLF4-зависимой транскрипцией гена  $\beta$ -глобина, причем деплеция  $\beta$ -глобина существенно увеличивала уровень апоптоза в раковых клетках. Предположительно, в СТС  $\beta$ -глобин выполняет роль цитопротектора



и обеспечивает выживание метастазирующих клеток в условиях постоянного взаимодействия с иммунными клетками и хронического окислительного стресса.

Помимо способности транспортировать и запасать кислород, гемоглобин сохранил эволюционно более древние функции глобинов — сенсорную и сигнальную. В случае тетрамерного гемоглобина эти функции обеспечиваются, в частности, его способностью взаимодействовать с NO. NO является одной из наиболее важных сигнальных молекул в организме теплокровных и эффектором редокс-регулируемой передачи сигнала, обусловленной наличием неспаренного электрона. Образование NO связано с энзиматической активностью NO-синтазы, нитрат- и нитрит-редуктазы и неэнзиматическим восстановлением нитрита. Молекула NO свободно проникает через мембраны синтезировавшей его клетки, диффундирует через межклеточное пространство и попадает в клетки-мишени. В клетках-мишенях NO, будучи высокореактивным радикалом, легко вступает в реакции с другими соединениями и выступает в качестве сигнальной молекулы, вызывая модификации белков, в том числе нитрозилируя цистеиновые остатки или связываясь с гемом растворимой гуанилатциклазы и запуская соответствующие сигнальные пути [92, 93].

Особую роль в регуляции тонуса сосудов играет экспрессия  $\alpha$ -глобина в местах контакта (myoendothelial junction, MEJ) эндотелиальных клеток с миоцитами сосудистой стенки периферических артерий [94–97]. Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) обеспечивает присутствие пула NO в клетках эндотелия. NO свободно диффундирует через MEJ и поглощается клетками мышечной стенки сосудов. В этих клетках NO запускает сигнальный каскад, который в конечном итоге вызывает вазодилатацию, увеличение оксигенации тканей и понижение давления.  $\alpha$ -Глобин регулирует биодоступность NO посредством редокс-зависимого шаттлинга  $\alpha$ -глобина между NO-синтазой и AHSP — специализированным шапероном, препятствующим преципитации мономерного  $\alpha$ -глобина. В условиях гипоксии или ацидоза AHSP секвестрирует  $Fe^{3+}$   $\alpha$ -глобин в инертном, но стабильном состоянии. Вследствие этого прекращается деградация глобином NO, обеспечивается вазодилатация и увеличивается оксигенация тканей. Эндотелиальная цитохром  $b_5$ -редуктаза обеспечивает переход железа из окисленного в восстановленное состояние. Когда железо находится в восстановленном состоянии ( $Fe^{2+}$ ), eNOS замещает AHSP в комплексе с глобином, синтезированный ею NO деградируется  $\alpha$ -глобином,

что вызывает прерывание сигнального каскада и последующую вазоконстрикцию. В этом случае  $\alpha$ -глобин является участником сложного надмолекулярного комплекса, который обеспечивает передачу сигнала между разными типами клеток, образующими стенку периферических артерий. Интересно, что гиперпродукция  $\alpha$ -глобина в клетках эндотелия легочных альвеолярных сосудов ассоциирована с развитием легочной гипертензии [98].

Таким образом, мономерный  $\alpha$ -глобин входит в состав сложных надмолекулярных комплексов, отличных от тетрамерного эритроцитарного гемоглобина.  $\alpha$ -Глобин в составе негемоглобинового надмолекулярного комплекса «вспоминает» эволюционно более древние функции, связанные с процессами окисления и восстановления низкомолекулярных веществ и передачи сигналов. Нельзя исключить, что сходным образом происходит образование комплексов  $\alpha$ - или  $\beta$ -глобина с другими тканеспецифичными формами eNOS.

К сожалению, молекулярные механизмы избирательной активации  $\alpha$ -глобиновых генов или  $\beta$ -глобиновых генов неясны. Возможно, в обоих случаях одним из факторов активации может быть транскрипционный статус фланкирующих генов. Возможность избирательной активации тесно связана с тем, что механизмы репрессии  $\alpha$ -глобиновых и  $\beta$ -глобиновых генов в неэритроидных тканях существенно различаются [99–102].  $\alpha$ -Глобиновые гены находятся в окружении генов домашнего хозяйства. Нельзя исключить, что низкоуровневая транскрипция  $\alpha$ -глобина может обеспечиваться простым их привлечением к рядом расположенной активно работающей в большинстве типов клеток транскрипционной фабрике. В эритроидных клетках такая ассоциация описана [103]. Уровень транскрипции  $\alpha$ -глобиновых генов в неэритроидных клетках может находиться в прямой зависимости от уровня транскрипции окружающих его генов, который, в свою очередь, может существенно отличаться в разных типах клеток.  $\beta$ -Глобин, в отличие от  $\alpha$ -глобина, в неэритроидных тканях гетерохроматизирован и окружен генами одорантных рецепторов, имеющими нейрональный характер экспрессии [36]. Активация генов одорантных рецепторов, которая в том числе возможна в ненейрональных тканях [104], может распространяться на соседствующий с ними домен  $\beta$ -глобиновых генов — в основном за счет изменения хроматинового статуса всего локуса, включая гены одорантных рецепторов.

Промоторы и энхансеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов связывают целый ряд общих транскрип-

ционных факторов, в том числе GATA1, KLF1, SCL, NF-E2, LMO2, NF-Y и другие [51, 105, 106]. Канонические активаторы транскрипции глобиновых генов в эритроблестах (GATA1, NFE2, KLF1), а также HIF-1 $\alpha$  часто обнаруживают в неэритроидных клетках как в норме, так и при воздействии разных стимулов (например, в условиях гипоксии или в ходе воспалительной реакции) [107–110].

Некоторые универсальные активаторы транскрипции и  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов могут действовать селективно в силу того, что механизмы репрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в неэритроидных тканях принципиально различаются. Поэтому конкуренция эпигенетического сайленсинга с универсальными активирующими транскрипционными факторами может иметь разные последствия для возможной селективной экспрессии  $\alpha$ -глобиновых и  $\beta$ -глобиновых генов.

Возможны альтернативные и более специфические механизмы активации независимой экспрессии глобиновых генов. Избирательная активация  $\beta$ -глобинового гена может быть связана с наличием ARE (ARE-antioxydant response elements) в составе  $\beta$ -глобина – регуляторных элементов, связывающих активатор транскрипции NRF2 [111]. Продукция NRF2 индуцируется в условиях оксидативного стресса [112]. Селективная экспрессия  $\alpha$ -глобиновых генов может индуцироваться NF- $\kappa$ B – фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, регуляторов апоптоза и клеточного цикла [113]. Индукция синтеза тетрамерного гемоглобина и связывание NF- $\kappa$ B в промоторе гена  $\alpha$ -глобина были продемонстрированы при обработке нормальных и трансформированных клеток цервикального эпителия липополисахаридами (LPS) [81]. Интересно, что в эритроидных клетках NF- $\kappa$ B, напротив, является репрессором транскрипции эмбрионального  $\alpha$ -глобина [114]. Таким образом, один и тот же транскрипционный фактор в зависимости от типа тканей и регуляторного контекста может иметь разнонаправленное действие.

Уровень экспрессии  $\alpha$ -глобина в клетках эндотелия коронарных артерий находится под контролем KLF2 и KLF4, причем KLF4 связывается с промотором  $\alpha$ -глобиновых генов [115]. Дополнительная механическая нагрузка на стенки артерий при гипертонии повышает уровень экспрессии этих транскрипционных факторов, в результате увеличивается содержание  $\alpha$ -глобина в эндотелии и падает эффективная концентрация NO. Это вносит свой вклад в развитие патологического процесса при гипертонии [116].

Высокий уровень транскрипции  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в эритроидных клетках обусловлен в первую очередь удаленными энхансерами, которые взаимодействуют с индивидуальными промоторами. Уровень как координированной, так и селективной экспрессии глобиновых генов в эритроблестах и неэритроидных тканях несопоставим. Представляется интересным выяснить, участвуют ли удаленные энхансеры в регуляции экспрессии глобиновых генов в неэритроидных клетках и связана ли независимая экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобина с селективным вовлечением энхансеров в регуляцию транскрипции.

### ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ СЕГРЕГАЦИИ $\alpha$ - И $\beta$ -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ У ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ Tetrapoda И Amniota

Из приведенных примеров очевидно, что у современных млекопитающих (а возможно и других Tetrapoda) возможна не только неэритроцитарная экспрессия гемоглобина, но и независимая экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов в неэритроидных тканях по поводу выполнения ими функций, никак не связанных ни с транспортом, ни с запасанием, ни с удерживанием кислорода. Возможно, важным условием независимой транскрипции и обусловленным этим обстоятельством расширения функционала явилась сегрегация эволюционно-древнего слитого локуса, в котором  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновые гены корегулировались. Предположительно, сегрегация слитого домена в ходе эволюции происходила неоднократно и независимо у отдельных систематических групп земноводных, у общего предка птиц и пресмыкающихся и у млекопитающих. Это позволяет заключить, что существовали общие условия, которые определили давление отбора в направлении сегрегации. Сегрегация  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов у Tetrapoda коррелировала с выходом позвоночных на сушу. Коренное изменение физиологии в связи с выходом на сушу потребовало развития дополнительных сенсорных возможностей и/или сигнальных путей, и именно это обусловило плейотропизацию протеома и усложнение многих сложившихся регуляторных сетей. С другой стороны, принципиальное изменение условий обитания сопровождалось расширением ассортимента стрессовых факторов: вынужденными периодами гипоксии и дегидратации, расширением диапазона температур среды обитания, ультрафиолетовым облучением и пр. Возможно, защита от оксидативного стресса для первых обитателей суши и первых Amniota

имела первостепенное значение не только из-за стрессовых факторов, но также из-за развития принципиально новых форм дыхания – кожного и легочного, в дополнение или альтернативно жаберному. Можно предположить, что вместе эти обстоятельства повлекли за собой временную (зависящую от стадии жизненного цикла или климатических условий) и/или локальную (зависящую от смены среды обитания) дисфункцию потребления кислорода как на физиологическом, так и на биохимическом уровнях, гиперпродукцию ROS и RNS, хронический оксидативный стресс и необходимость привлечения дополнительных механизмов антистрессовой защиты. В нормальных условиях примерно 90% ROS в клетке образуются в митохондриях из-за утечки 1–2% электронов в дыхательной цепи [117]. Активные формы кислорода представляют собой гетерогенный класс соединений, которые способны окислять все известные биомолекулы. В нормальных физиологических условиях ROS принимают участие в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов, а также играют важную роль в иммунном ответе. Координированная работа дыхательной цепи митохондрий, комплекса оксидаз и антиоксидантной системы обеспечивает поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клетки [118]. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза клетки под действием внешних (гипероксия, ионизирующая радиация и т.п.) или внутренних факторов (активация оксидаз, нарушение функции антиоксидантов) приводит к гиперпродукции ROS и их производных (нитрозилирующие агенты, гипогалогениты, карбонилы и др.), что вызывает окислительные повреждения всех важнейших биологических макромолекул (ДНК, белки, липиды и углеводы) и приводит к развитию окислительного стресса, лежащего в основе многих патологических состояний. Токсическое действие высоких концентраций ROS предотвращается широким спектром низкомолекулярных антиоксидантов и комплексом специализированных антиоксидантных ферментов [119]. Как тетрамерный гемоглобин, так и мономерные  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобины могут участвовать в нейтрализации ROS в условиях оксидативного стресса, когда и если канонические факторы нейтрализации оказываются недостаточными. Интересно, что в условиях сезонного перехода от гипоксии к нормальному дыханию и связанного с этим переходом оксидативного стресса, гемоглобин некоторых видов черепах полимеризуется за счет образования дисульфидных связей между молекулами тетрамерного гемоглобина и таким образом участвует в нейтрализации активных

форм кислорода [120]. Антиоксидантная защита – только одна из возможных неканонических функций мономерных  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобинов. К сожалению, мы можем только догадываться о том, какие конкретно условия изменившейся среды обитания потребовали независимой экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов у предковых форм Amniota в связи с их окончательным разрывом с водной средой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегрегация предкового домена  $\alpha/\beta$ -глобиновых генов, которая повторялась неоднократно в ходе эволюции позвоночных, по всей видимости, носила закономерный характер. Сегрегация сделала возможной независимую экспрессию  $\alpha$ - или  $\beta$ -глобиновых генов и была важной составной частью грандиозного «проекта плейотропизации» генов и возникновения инновационных приспособительных механизмов в связи с выходом на сушу и полным разрывом с водной средой обитания. Кластеризация корегулируемых генов может в ходе эволюции утрачиваться в силу того, что преимущества кластеризации постепенно нивелируются, тогда как сегрегация предоставляет новые регуляторные и функциональные возможности. Соответственно, давление отбора может быть разнонаправленным – как в сторону сохранения кластеризованной организации дублированных корегулируемых паралогов, так и в направлении изоляции и последующей сегрегации генов. Начинаясь на уровне мультипликации регуляторных элементов и сегрегации функциональных субдоменов, изоляция может завершиться разрывом кластера дублированных генов, транслокацией на другую хромосому, принципиальным изменением геномного и регуляторного контекста транслоцированного локуса, а, возможно, и характера тканеспецифической экспрессии. Именно эта логика направляла эволюцию  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов позвоночных. По нашему предположению, обусловленная сегрегацией независимая экспрессия  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов могла играть важную роль у предков Amniota, в том числе обеспечивая защиту первых сухопутных позвоночных от стрессовых факторов новой среды обитания.

**Вклад авторов.** Все авторы участвовали в выработке концепции и написании обзора.

**Финансирование.** Работа С.В. Разина поддержана Российским научным фондом (грант № 21-64-00001). Работа О.В. Яровой поддержа-



на Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-04-00003).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Simone, G., Quattrocchi, A., Mancini, B., di Masi, A., Nervi, C., et al. (2022) Thalasseмии: from gene to therapy, *Mol. Aspects Med.*, **84**, 101028, doi: 10.1016/j.mam.2021.101028.
- Fromm, G., and Bulger, M. (2009) A spectrum of gene regulatory phenomena at mammalian beta-globin gene loci, *Biochem. Cell Biol.*, **87**, 781-790, doi: 10.1139/O09-048.
- Hardison, R. C. (2012) Evolution of hemoglobin and its genes, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**, a011627, doi: 10.1101/cshperspect.a011627.
- Hoffmann, F. G., Vandeweghe, M. W., Storz, J. F., and Opazo, J. C. (2018) Gene turnover and diversification of the alpha- and beta-globin gene families in sauropsid vertebrates, *Genome Biol. Evol.*, **10**, 344-358, doi: 10.1093/gbe/evy001.
- Iarovaia, O. V., Ioudinkova, E. S., Petrova, N. V., Dolgushin, K. V., Kovina, A. V., et al. (2014) Evolution of alpha- and beta-globin genes and their regulatory systems in light of the hypothesis of domain organization of the genome, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1141-1150, doi: 10.1134/S0006297914110017.
- Kattamis, A., Kwiatkowski, J. L., and Aydinok, Y. (2022) Thalassaemia, *Lancet*, **399**, 2310-2324, doi: 10.1016/S0140-6736(22)00536-0.
- Mettananda, S., Gibbons, R. J., and Higgs, D. R. (2016) Understanding alpha-globin gene regulation and implications for the treatment of beta-thalassaemia, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1368**, 16-24, doi: 10.1111/nyas.12988.
- Oudelaar, A. M., Beagrie, R. A., Kassouf, M. T., and Higgs, D. R. (2021) The mouse alpha-globin cluster: a paradigm for studying genome regulation and organization, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **67**, 18-24, doi: 10.1016/j.gde.2020.10.003.
- Philipsen, S., and Hardison, R. C. (2018) Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements, *Blood Cells Mol. Diseases*, **70**, 2-12, doi: 10.1016/j.bcmd.2017.08.001.
- Razin, S. V., Ulianov, S. V., Ioudinkova, E. S., Gushchanskaya, E. S., Gavrilov, A. A., et al. (2012) Domains of alpha- and beta-globin genes in the context of the structural-functional organization of the eukaryotic genome, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1409-1423, doi: 10.1134/S0006297912130019.
- Recillas-Targa, F., and Razin, S. V. (2001) Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Express.*, **11**, 227-242.
- Hardison, R. C. (2008) Globin genes on the move, *J. Biol.*, **7**, 35, doi: 10.1186/jbiol92.
- Vinogradov, S. N., and Moens, L. (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8773-8777, doi: 10.1074/jbc.R700029200.
- Burmester, T., and Hankeln, T. (2014) Function and evolution of vertebrate globins, *Acta Physiol.*, **211**, 501-514, doi: 10.1111/apha.12312.
- Keppner, A., Maric, D., Correia, M., Koay, T. W., Orlando, I. M. C., et al. (2020) Lessons from the post-genomic era: Globin diversity beyond oxygen binding and transport, *Redox Biol.*, **37**, 101687, doi: 10.1016/j.redox.2020.101687.
- Song, S., Starunov, V., Bailly, X., Ruta, C., Kerner, P., et al. (2020) Globins in the marine annelid *Platynereis dumerilii* shed new light on hemoglobin evolution in bilaterians, *BMC Evol. Biol.*, **20**, 165, doi: 10.1186/s12862-020-01714-4.
- Hoffmann, F. G., Opazo, J. C., and Storz, J. F. (2012) Whole-genome duplications spurred the functional diversification of the globin gene superfamily in vertebrates, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 303-312, doi: 10.1093/molbev/msr207.
- Miyata, M., Gillemans, N., Hockman, D., Demmers, J. A. A., Cheng, J. F., et al. (2020) An evolutionarily ancient mechanism for regulation of hemoglobin expression in vertebrate red cells, *Blood*, **136**, 269-278, doi: 10.1182/blood.2020004826.
- Storz, J. F., Opazo, J. C., and Hoffmann, F. G. (2013) Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **66**, 469-478, doi: 10.1016/j.ympev.2012.07.013.
- Pelleg, A., and Porter, R. S. (1990) The pharmacology of adenosine, *Pharmacotherapy*, **10**, 157-174.
- Pillai, A. S., Chandler, S. A., Liu, Y., Signore, A. V., Cortez-Romero, C. R., et al. (2020) Origin of complexity in haemoglobin evolution, *Nature*, **581**, 480-485, doi: 10.1038/s41586-020-2292-y.
- Weber, R. E., and Fago, A. (2004) Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins, *Respirat. Physiol. Neurobiol.*, **144**, 141-159, doi: 10.1016/j.resp.2004.04.018.
- Ganis, J. J., Hsia, N., Trompouki, E., de Jong, J. L., DiBiase, A., et al. (2012) Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR, *Dev. Biol.*, **366**, 185-194, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.03.021.
- Nefedochkina, A. V., Petrova, N. V., Ioudinkova, E. S., Kovina, A. P., Iarovaia, O. V., et al. (2016) Characterization of the enhancer element of the *Danio rerio* minor globin gene locus, *Histochem. Cell Biol.*, **145**, 463-473, doi: 10.1007/s00418-016-1413-z.
- Hosbach, H. A., Wyler, T., and Weber, R. (1983) The *Xenopus laevis* globin gene family: chromosom-



- al arrangement and gene structure, *Cell*, **32**, 45-53, doi: 10.1016/0092-8674(83)90495-6.
26. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Wood, D., Simons, J. P., Kay, R. M., et al. (1980) Linkage of adult alpha- and beta-globin genes in *X. laevis* and gene duplication by tetraploidization, *Cell*, **21**, 555-564, doi: 10.1016/0092-8674(80)90493-6.
  27. Queiroz, J. P. F., Lima, N. C. B., and Rocha, B. A. M. (2021) The rise and fall of globins in the amphibia, *Compar. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, **37**, 100759, doi: 10.1016/j.cbd.2020.100759.
  28. Fuchs, C., Burmester, T., and Hankeln, T. (2006) The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome, *Cytogenet. Genome Res.*, **112**, 296-306, doi: 10.1159/000089884.
  29. Patel, V. S., Cooper, S. J., Deakin, J. E., Fulton, B., Graves, T., et al. (2008) Platypus globin genes and flanking loci suggest a new insertional model for beta-globin evolution in birds and mammals, *BMC Biol.*, **6**, 34, doi: 10.1186/1741-7007-6-34.
  30. Hughes, J. R., Cheng, J. F., Ventress, N., Prabhakar, S., Clark, K., et al. (2005) Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9830-9835, doi: 10.1073/pnas.0503401102.
  31. Filonenko, E. S., Gavrilov, A. A., Razin, S. V., and Iarovaia, O. V. (2010) Expansion of the functional domain of chicken alpha-globin genes [in Russian], *Genetika*, **46**, 1164-1167.
  32. Philonenko, E. S., Klochkov, D. B., Borunova, V. V., Gavrilov, A. A., Razin, S. V., et al. (2009) TMEM8 — a non-globin gene entrapped in the globin web, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7394-7406, doi: 10.1093/nar/gkp838.
  33. De Leo, A. A., Wheeler, D., Lefevre, C., Cheng, J. F., Hope, R., et al. (2005) Sequencing and mapping hemoglobin gene clusters in the Australian model dasyurid marsupial *Sminthopsis macroura*, *Cytogenet. Genome Res.*, **108**, 333-341, doi: 10.1159/000081528.
  34. Opazo, J. C., Hoffmann, F. G., and Storz, J. F. (2008) Genomic evidence for independent origins of beta-like globin genes in monotremes and therian mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1590-1595, doi: 10.1073/pnas.0710531105.
  35. Wheeler, D., Hope, R. M., Cooper, S. J., Gooley, A. A., and Holland, R. A. (2004) Linkage of the beta-like omega-globin gene to alpha-like globin genes in an Australian marsupial supports the chromosome duplication model for separation of globin gene clusters, *J. Mol. Evol.*, **58**, 642-652, doi: 10.1007/s00239-004-2584-0.
  36. Bulger, M., van Doorninck, J. H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., et al. (1999) Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5129-5134, doi: 10.1073/pnas.96.9.5129.
  37. Palstra, R. J., de Laat, W., and Grosveld, F. (2008) Beta-globin regulation and long-range interactions, *Adv. Genetics*, **61**, 107-142, doi: 10.1016/S0065-2660(07)00004-1.
  38. Kovina, A. P., Petrova, N. V., Gushchanskaya, E. S., Dolgushin, K. V., Gerasimov, E. S., et al. (2017) Evolution of the genome 3D organization: comparison of fused and segregated globin gene clusters, *Mol. Biol. Evol.*, **34**, 1492-1504, doi: 10.1093/molbev/msx100.
  39. Hay, D., Hughes, J. R., Babbs, C., Davies, J. O. J., Graham, B. J., et al. (2016) Genetic dissection of the alpha-globin super-enhancer *in vivo*, *Nat. Genet.*, **48**, 895-903, doi: 10.1038/ng.3605.
  40. Garcia-Gonzalez, E., and Recillas-Targa, F. (2014) A regulatory element affects the activity and chromatin structure of the chicken alpha-globin 3' enhancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 1233-1241, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.09.009.
  41. Bulger, M., Bender, M. A., van Doorninck, J. H., Wertman, B., Farrell, C. M., et al. (2000) Comparative structural and functional analysis of the olfactory receptor genes flanking the human and mouse beta-globin gene clusters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14560-14565, doi: 10.1073/pnas.97.26.14560.
  42. Bulger, M., and Groudine, M. (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation, *Genes Dev.*, **13**, 2465-2477, doi: 10.1101/gad.13.19.2465.
  43. Levings, P. P., and Bungert, J. (2002) The human beta-globin locus control region, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1589-1599, doi: 10.1046/j.1432-1327.2002.02797.x.
  44. Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002) Locus control regions, *Blood*, **100**, 3077-3086, doi: 10.1182/blood-2002-04-1104.
  45. Choi, O. R., and Engel, J. D. (1986) A 3' enhancer is required for temporal and tissue-specific transcriptional activation of the chicken adult beta-globin gene, *Nature*, **323**, 731-734, doi: 10.1038/323731a0.
  46. Chung, J. H., Bell, A. C., and Felsenfeld, G. (1997) Characterization of the chicken beta-globin insulator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 575-580, doi: 10.1073/pnas.94.2.575.
  47. Rival-Gervier, S., Pantano, T., Viglietta, C., Maeder, C., Prince, S., et al. (2003) The insulator effect of the 5'HS4 region from the beta-globin chicken locus on the rabbit WAP gene promoter activity in transgenic mice, *Transgenic Res.*, **12**, 723-730, doi: 10.1023/b:trag.0000005242.72076.d1.
  48. Wallace, J. A., and Felsenfeld, G. (2007) We gather together: insulators and genome organization, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **17**, 400-407, doi: 10.1016/j.gde.2007.08.005.
  49. De Laat, W., and Grosveld, F. (2003) Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub, *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, **11**, 447-459, doi: 10.1023/a:1024922626726.
  50. Oudelaar, A. M., Harrold, C. L., Hanssen, L. L. P., Telenius, J. M., Higgs, D. R., et al. (2019) A revised model for promoter competition based on multi-way chromatin interactions at the alpha-globin locus, *Nat. Commun.*, **10**, 5412, doi: 10.1038/s41467-019-13404-x.
  51. Vernimmen, D., Marques-Kranc, F., Sharpe, J. A., Sloane-Stanley, J. A., Wood, W. G., et al. (2009) Chromosome looping at the human alpha-globin

- locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS-40), *Blood*, **114**, 4253-4260, doi: 10.1182/blood-2009-03-213439.
52. Saha, D., Patgaonkar, M., Shroff, A., Ayyar, K., Bashir, T., et al. (2014) Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous? *Int. J. Inflamm.*, **2014**, 803237, doi: 10.1155/2014/803237.
53. Russo, R., Zucchelli, S., Codrich, M., Marcuzzi, F., Verde, C., and Gustinich, S. (2013) Hemoglobin is present as a canonical  $\alpha_2\beta_2$  tetramer in dopaminergic neurons, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1939-1943, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.05.005.
54. Tezel, T. H., Geng, L., Lato, E. B., Schaal, S., Liu, Y., et al. (2009) Synthesis and secretion of hemoglobin by retinal pigment epithelium, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 1911-1919, doi: 10.1167/iovs.07-1372.
55. Wu, C. W., Liao, P. C., Yu, L., Wang, S. T., Chen, S. T., et al. (2004) Hemoglobin promotes A $\beta$  oligomer formation and localizes in neurons and amyloid deposits, *Neurobiol. Disease*, **17**, 367-377, doi: 10.1016/j.nbd.2004.08.014.
56. Biagioli, M., Pinto, M., Cesselli, D., Zaninello, M., Lazarevic, D., et al. (2009) Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15454-15459, doi: 10.1073/pnas.0813216106.
57. Schelshorn, D. W., Schneider, A., Kuschinsky, W., Weber, D., Kruger, C., et al. (2009) Expression of hemoglobin in rodent neurons, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 585-595, doi: 10.1038/jcbfm.2008.152.
58. Richter, F., Meurers, B. H., Zhu, C., Medvedeva, V. P., and Chesselet, M. F. (2009) Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains, *J. Compar. Neurol.*, **515**, 538-547, doi: 10.1002/cne.22062.
59. Dassen, H., Kamps, R., Punyadeera, C., Dijcks, F., de Goeij, A., et al. (2008) Haemoglobin expression in human endometrium, *Hum. Reprod.*, **23**, 635-641, doi: 10.1093/humrep/dem430.
60. Babalola, O. E., Danboyi, P., and Abiose, A. A. (2000) Hereditary congenital cataracts associated with sickle cell anaemia in a Nigerian family, *Tropic. Doc.*, **30**, 12-14, doi: 10.1177/004947550003000107.
61. Wride, M. A., Mansergh, F. C., Adams, S., Everitt, R., Minnema, S. E., et al. (2003) Expression profiling and gene discovery in the mouse lens, *Mol. Vis.*, **9**, 360-396.
62. Alayash, A. I., Patel, R. P., and Cashon, R. E. (2001) Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications, *Antioxid. Redox Signal.*, **3**, 313-327, doi: 10.1089/152308601300185250.
63. Goldstein, S., and Samuni, A. (2005) Intra- and intermolecular oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin induced by hydroxyl and carbonate radicals, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 511-519, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.003.
64. Masuoka, N., Kodama, H., Abe, T., Wang, D. H., and Nakano, T. (2003) Characterization of hydrogen peroxide removal reaction by hemoglobin in the presence of reduced pyridine nucleotides, *Biochim. Biophys. Acta*, **1637**, 46-54, doi: 10.1016/s0925-4439(02)00213-2.
65. Reeder, B. J. (2017) Redox and peroxidase activities of the hemoglobin superfamily: relevance to health and disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 763-776, doi: 10.1089/ars.2016.6803.
66. Franco, R., Navarro, G., and Martinez-Pinilla, E. (2019) Antioxidant defense mechanisms in erythrocytes and in the central nervous system, *Antioxidants*, **8**, doi: 10.3390/antiox8020046.
67. Liu, W., Baker, S. S., Baker, R. D., Nowak, N. J., and Zhu, L. (2011) Upregulation of hemoglobin expression by oxidative stress in hepatocytes and its implication in nonalcoholic steatohepatitis, *PLoS One*, **6**, e24363, doi: 10.1371/journal.pone.0024363.
68. Nishi, H., Inagi, R., Kato, H., Tanemoto, M., Kojima, I., et al. (2008) Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**, 1500-1508, doi: 10.1681/ASN.2007101085.
69. Brown, N., Alkhayer, K., Clements, R., Singhal, N., Gregory, R., et al. (2016) Neuronal hemoglobin expression and its relevance to multiple sclerosis neuropathology, *J. Mol. Neurosci.*, **59**, 1-17, doi: 10.1007/s12031-015-0711-6.
70. Codrich, M., Bertuzzi, M., Russo, R., Francescatti, M., Espinoza, S., et al. (2017) Neuronal hemoglobin affects dopaminergic cells' response to stress, *Cell Death Disease*, **8**, e2538, doi: 10.1038/cddis.2016.458.
71. Shephard, F., Greville-Heygate, O., Marsh, O., Anderson, S., and Chakrabarti, L. (2014) A mitochondrial location for haemoglobins – dynamic distribution in ageing and Parkinson's disease, *Mitochondrion*, **14**, 64-72, doi: 10.1016/j.mito.2013.12.001.
72. Shirai, T., Imori, H., Konomi, G., Ikuta, T., Minoda, H., et al. (1989) Trace elements in patients on chronic hemodialysis. 1. Plasma aluminium, *Fukuoka Shika Daigaku Gakkai zasshi*, **16**, 1-10.
73. Bhaskaran, M., Chen, H., Chen, Z., and Liu, L. (2005) Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 1348-1352, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.042.
74. Newton, D. A., Rao, K. M., Dluhy, R. A., and Baatz, J. E. (2006) Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **281**, 5668-5676, doi: 10.1074/jbc.M509314200.
75. Grek, C. L., Newton, D. A., Spyropoulos, D. D., and Baatz, J. E. (2011) Hypoxia up-regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells, *Am. J. Respirat. Cell Mol. Biol.*, **44**, 439-447, doi: 10.1165/rcmb.2009-0307OC.
76. Emará, M., Turner, A. R., and Allalunis-Turner, J. (2014) Adult, embryonic and fetal hemoglobin are expressed in human glioblastoma cells, *Int. J. Oncol.*, **44**, 514-520, doi: 10.3892/ijo.2013.2186.
77. Funnell, A. P., Vernimmen, D., Lim, W. F., Mak, K. S., Wienert, B., et al. (2014) Differential regulation of the alpha-globin locus by Kruppel-like Factor 3 in erythroid and non-erythroid cells, *BMC Mol. Biol.*, **15**, 8, doi: 10.1186/1471-2199-15-8.

78. Gorr, T. A., Wichmann, D., Pilarsky, C., Theurillat, J. P., Fabrizius, A., et al. (2011) Old proteins — new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells, *Acta Physiol.*, **202**, 563-581, doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02205.x.
79. Li, X., Wu, Z., Wang, Y., Mei, Q., Fu, X., and Han, W. (2013) Characterization of adult alpha- and beta-globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults, *PLoS One*, **8**, e54342, doi: 10.1371/journal.pone.0054342.
80. Patgaonkar, M., Aranha, C., Bhone, G., and Reddy, K. V. (2011) Identification and characterization of anti-microbial peptides from rabbit vaginal fluid, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **139**, 176-186, doi: 10.1016/j.vetimm.2010.10.012.
81. Saha, D., Koli, S., Patgaonkar, M., and Reddy, K. V. (2017) Expression of hemoglobin-alpha and beta subunits in human vaginal epithelial cells and their functional significance, *PLoS One*, **12**, e0171084, doi: 10.1371/journal.pone.0171084.
82. Coates, C. J., and Decker, H. (2017) Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 293-317, doi: 10.1007/s00018-016-2326-7.
83. Jeney, V., Eaton, J. W., Balla, G., and Balla, J. (2013) Natural history of the bruise: formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin, *Oxid. Med. Cellular Longev.*, **2013**, 703571, doi: 10.1155/2013/703571.
84. Shaver, C. M., Upchurch, C. P., Janz, D. R., Grove, B. S., Putz, N. D., et al. (2016) Cell-free hemoglobin: a novel mediator of acute lung injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **310**, L532-541, doi: 10.1152/ajplung.00155.2015.
85. Zhong, Q., Zhou, K., Liang, Q. L., Lin, S., Wang, Y. C., et al. (2016) Interleukin-23 secreted by activated macrophages drives gamma delta T cell production of interleukin-17 to aggravate secondary injury after intracerebral hemorrhage, *J. Am. Heart Assoc.*, **5**, doi: 10.1161/JAHA.116.004340.
86. Li, D., Dong, H., Li, S., Munir, M., Chen, J., et al. (2013) Hemoglobin subunit beta interacts with the capsid protein and antagonizes the growth of classical swine fever virus, *J. Virol.*, **87**, 5707-5717, doi: 10.1128/JVI.03130-12.
87. Yang, Q., Bai, S. Y., Li, L. F., Li, S., Zhang, Y., et al. (2019) Human hemoglobin subunit beta functions as a pleiotropic regulator of RIG-I/MDA5-mediated antiviral innate immune responses, *J. Virol.*, **93**, doi: 10.1128/JVI.00718-19.
88. Masoumi, Z., Erlandsson, L., Hansson, E., Magnusson, M., Mezey, E., et al. (2021) Hypoxia-induced alpha-globin expression in syncytiotrophoblasts mimics the pattern observed in pre-eclamptic placentas, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22073357.
89. Derakhshani, A., Safarpour, H., Abdoli Shadbad, M., Hemmat, N., Leone, P., et al. (2021) The role of hemoglobin subunit delta in the immunopathology of multiple sclerosis: mitochondria maters, *Front. Immunol.*, **12**, 709173, doi: 10.3389/fimmu.2021.709173.
90. Liu, L., Zeng, M., and Stamler, J. S. (1999) Hemoglobin induction in mouse macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6643-6647, doi: 10.1073/pnas.96.12.6643.
91. Zheng, Y., Miyamoto, D. T., Wittner, B. S., Sullivan, J. P., Aceto, N., et al. (2017) Expression of beta-globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination, *Nat. Commun.*, **8**, 14344, doi: 10.1038/ncomms14344.
92. Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., and Misra, M. K. (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 227-237, doi: 10.1155/S1110724304402034.
93. Kleschyov, A. L. (2017) The NO-heme signaling hypothesis, *Free Radic. Biol. Med.*, **112**, 544-552, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.025.
94. Lechavue, C., Butcher, J. T., Freiwang, A., Biwer, L. A., Keith, J. M., et al. (2018) Endothelial cell alpha-globin and its molecular chaperone alpha-hemoglobin-stabilizing protein regulate arteriolar contractility, *J. Clin. Invest.*, **128**, 5073-5082, doi: 10.1172/JCI99933.
95. Parikh, J., Kapela, A., and Tsoukias, N. M. (2017) Can endothelial hemoglobin-alpha regulate nitric oxide vasodilatory signaling? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **312**, H854-H866, doi: 10.1152/ajpheart.00315.2016.
96. Shu, X., Ruddiman, C. A., Keller, T. C. S. 4th., Keller, A. S., Yang, Y., et al. (2019) Heterocellular contact can dictate arterial function, *Circ. Res.*, **124**, 1473-1481, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313926.
97. Straub, A. C., Lohman, A. W., Billaud, M., Johnstone, S. R., Dwyer, S. T., et al. (2012) Endothelial cell expression of haemoglobin alpha regulates nitric oxide signalling, *Nature*, **491**, 473-477, doi: 10.1038/nature11626.
98. Alvarez, R. A., Miller, M. P., Hahn, S. A., Galley, J. C., Bauer, E., et al. (2017) Targeting pulmonary endothelial hemoglobin alpha improves nitric oxide signaling and reverses pulmonary artery endothelial dysfunction, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **57**, 733-744, doi: 10.1165/rcmb.2016-0418OC.
99. Cao, A., and Moi, P. (2002) Regulation of the globin genes, *Pediatr. Res.*, **51**, 415-421, doi: 10.1203/00006450-200204000-00003.
100. Garrick, D., De Gobbi, M., Samara, V., Rugless, M., Holland, M., et al. (2008) The role of the polycomb complex in silencing alpha-globin gene expression in nonerythroid cells, *Blood*, **112**, 3889-3899, doi: 10.1182/blood-2008-06-161901.
101. Iarovaia, O. V., Kovina, A. P., Petrova, N. V., Razin, S. V., Ioudinkova, E. S., et al. (2018) Genetic and epigenetic mechanisms of beta-globin gene switching, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 381-392, doi: 10.1134/S0006297918040090.
102. Petrova, N. V., Klimenko, N. S., Kovina, A. P., Ioudinkova, E. S., Gavrilov, A. A., et al. (2021) Mechanisms mediating suppression of globin gene transcription in *Danio rerio* nonerythroid cells, *Biochimie*, **181**, 96-99, doi: 10.1016/j.biochi.2020.11.021.



103. Zhou, G. L., Xin, L., Song, W., Di, L. J., Liu, G., et al. (2006) Active chromatin hub of the mouse alpha-globin locus forms in a transcription factory of clustered housekeeping genes, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5096-5105, doi: 10.1128/MCB.02454-05.
104. Feldmesser, E., Olender, T., Khen, M., Yanai, I., Ophir, R., et al. (2006) Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes, *BMC Genom.*, **7**, 121, doi: 10.1186/1471-2164-7-121.
105. Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners, *Oncogene*, **21**, 3368-3376, doi: 10.1038/sj.onc.1205326.
106. Higgs, D. R., Vernimmen, D., and Wood, B. (2008) Long-range regulation of alpha-globin gene expression, *Adv. Genet.*, **61**, 143-173, doi: 10.1016/S0065-2660(07)00005-3.
107. Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., and Johnson, R. S. (2014) HIF transcription factors, inflammation, and immunity, *Immunity*, **41**, 518-528, doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008.
108. Imtiyaz, H. Z., and Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **345**, 105-120, doi: 10.1007/82\_2010\_74.
109. Hasselbalch, H. C. (2014) A role of NF-E2 in chronic inflammation and clonal evolution in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis? *Leuk. Res.*, **38**, 263-266, doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.002.
110. Jain, M. K., Sangwung, P., and Hamik, A. (2014) Regulation of an inflammatory disease: Kruppel-like factors and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34**, 499-508, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301925.
111. Kasai, S., Mimura, J., Ozaki, T., and Itoh, K. (2018) Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, Heme, and hemoglobin metabolism in physiology and disease, *Front. Vet. Sci.*, **5**, 242, doi: 10.3389/fvets.2018.00242.
112. Ma, Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**, 401-426, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
113. Taniguchi, K., and Karin, M. (2018) NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 309-324, doi: 10.1038/nri.2017.142.
114. Hou, C. H., Huang, J., and Qian, R. L. (2002) Identification of a NF-kappaB site in the negative regulatory element (epsilon-NRAII) of human epsilon-globin gene and its binding protein NF-kappaB p50 in the nuclei of K562 cells, *Cell Res.*, **12**, 79-82, doi: 10.1038/sj.cr.7290113.
115. Sangwung, P., Zhou, G., Lu, Y., Liao, X., Wang, B., et al. (2017) Regulation of endothelial hemoglobin alpha expression by Kruppel-like factors, *Vasc. Med.*, **22**, 363-369, doi: 10.1177/1358863X17722211.
116. Nayak, L., Lin, Z., and Jain, M. K. (2011) "Go with the flow": how Kruppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1449-1461, doi: 10.1089/ars.2010.3647.
117. McCord, J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am. J. Med.*, **108**, 652-659, doi: 10.1016/s0002-9343(00)00412-5.
118. Heinrich, J. (1988) Cardiotocography practice. Case 16, *Zentralblatt fur Gynakologie*, **110**, 1604-1605.
119. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017) Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species, *Cell. Physiol. Biochem.*, **44**, 532-553, doi: 10.1159/000485089.
120. Petersen, A. G., Petersen, S. V., Frische, S., Drakulic, S., Golas, M. M., et al. (2018) Hemoglobin polymerization via disulfide bond formation in the hypoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*: implications for antioxidant defense and O2 transport, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **314**, R84-R93, doi: 10.1152/ajpregu.00024.2017.

## SEGREGATION OF $\alpha$ - AND $\beta$ -GLOBIN GENE CLUSTERS IN VERTEBRATE EVOLUTION: CHANCE OR NECESSITY?

### Review

O. V. Iarovaia<sup>1\*</sup>, S. V. Ulianov<sup>1,2</sup>, E. S. Ioudinkova<sup>1</sup>, and S. V. Razin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,  
119334 Moscow, Russia; E-mail: iarovaia@inbox.ru

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

The review is devoted to the patterns of evolution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene domains. A hypothesis is presented according to which the segregation of the ancestral cluster of  $\alpha/\beta$ -globin genes in Amniota is due to the performance by  $\alpha$ -globins and  $\beta$ -globins of non-canonical functions not related to oxygen transport.

*Keywords:* evolution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin genes, regulation of transcription, non-canonical functions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globins



УДК 5.57.577

## ДИСФУНКЦИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРУЕМЫХ С КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ И АПОПТОЗОМ, РАЗВИВАЮЩАЯСЯ В ГИПОТАЛАМУСЕ САМЦОВ МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

© 2022 А.Г. Галямина<sup>1#</sup>, Д.А. Смагин<sup>1#</sup>, И.Л. Коваленко<sup>1</sup>, О.Е. Редина<sup>1</sup>,  
В.Н. Бабенко<sup>1</sup>, Н.Н. Кудрявцева<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,  
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: [natnik@bionet.nsc.ru](mailto:natnik@bionet.nsc.ru)

<sup>2</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 15.08.2022

После доработки 25.08.2022

Принята к публикации 25.08.2022

Хронический социальный стресс, вызванный ежедневными агонистическими взаимодействиями, приводит к развитию смешанного тревожно/депрессивного расстройства, которое сопровождается формированием психогенного иммунодефицита и стимуляцией онкологических процессов, а также многими нейрогенными изменениями в мозге самцов мышей. Целью исследования было выявить дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), ассоциируемые с механизмами канцерогенеза и апоптоза в гипоталамусе депрессивных мышей и, для сравнения, у агрессивных самцов мышей с позитивным социальным опытом в межсамцовых конфронтациях. Для получения животных с 20-дневным альтернативным социальным опытом (побед и поражений) была использована модель хронического социального конфликта. Результаты транскриптомного анализа (RNA-Seq) выявили сходные изменения многих ДЭГ у агрессивных и депрессивных животных по отношению к контрольному состоянию, однако число генов и выраженность изменений их экспрессии были существенно меньше у агрессивных, чем у депрессивных самцов. Можно полагать, что однонаправленное изменение экспрессии генов, ассоциированных с процессами онкогенеза и апоптоза, может быть следствием длительного стрессирующего воздействия разной выраженности в гипоталамусе самцов обеих экспериментальных групп. Кроме того, были выделены 26 генов, не изменивших экспрессию у агрессивных животных, которые могут рассматриваться как провоцирующие развитие канцерогенеза или ингибирующие апоптоз. В результате анализа данных были выделены гены *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10* и *Xiap*, экспрессия которых в наибольшей степени была скоррелирована с экспрессией других ДЭГ, что позволяет выдвинуть их на роль генов, кодирующих белки, обеспечивающие скоординированность нейрогенных изменений в гипоталамусе. Дальнейшее изучение роли этих генов может быть полезным для разработки методов фармакологической коррекции психосоматических патологий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, канцерогенез, RNA-Seq, ДЭГ, гипоталамус, хронический социальный стресс.

DOI: 10.31857/S032097252209010X, EDN: BBFBTO

### ВВЕДЕНИЕ

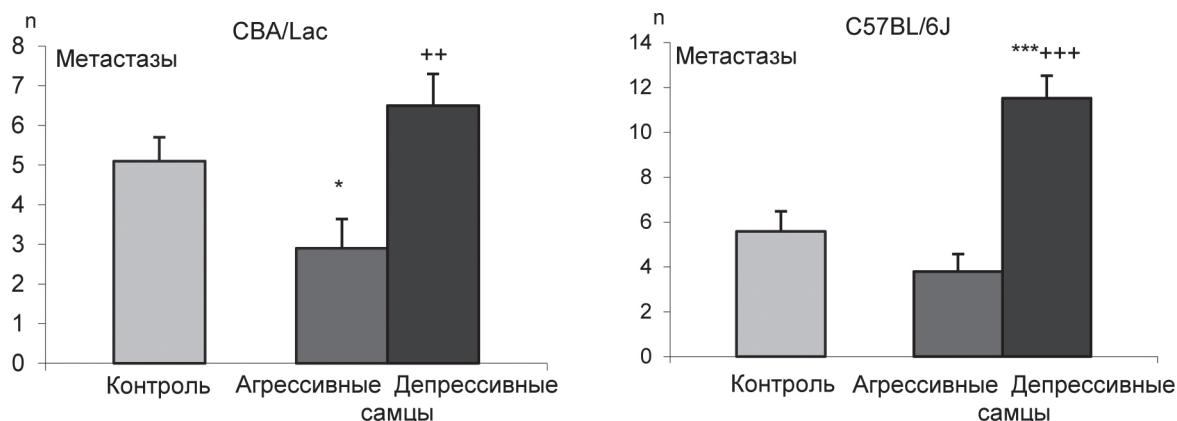
В результате многолетних исследований было показано, что хронический социальный стресс, вызванный повторным негативным опытом поражений в ежедневных межсамцо-

вых агонистических взаимодействиях, приводит к формированию смешанного тревожно/депрессивного расстройства у мышей [1–3], которое сопровождается развитием иммуносупрессии, проявляющейся в снижении общей резистентности и многих показателей гуморального и клеточного иммунитета [4–11], что позволяло говорить о развитии психогенного иммунодефицита [10] в этих условиях. На фоне сниженного иммунитета у депрессивных животных наблюдалось усиление метастазирования прививаемых опухолевых клеток

Принятые сокращения: ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.



**Рис. 1.** Метастазы (n) в лёгких у агрессивных и депрессивных самцов мышей. Опухолевые клетки гепатокарциномы-29 вводили в хвостовую вену мышей линии CBA/Lac (контрольные, агрессивные и депрессивные самцы). Аналогичным образом вводили соответствующим группам мышей линии C57BL/6 опухолевые клетки карциномы лёгких Льюиса. На 16-й день после инъекции опухолевых клеток подсчитывали число метастазов в лёгких. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  по сравнению с агрессивными мышами [14]

по сравнению с контрольными животными и агрессивными самцами с повторным позитивным социальным опытом [12–14] (рис. 1). Различная интенсивность метастазирования первичных опухолей Кребс-2, карциномы лёгких Льюиса (Levis lung carcinoma, LLC) и гепатокарциномы-29 (H-29) у животных экспериментальных групп свидетельствовала о выраженном и хорошо воспроизводимом влиянии социального опыта у мышей.

В контексте взаимосвязи депрессивной симптоматики с процессами снижения иммунитета и, как следствие, повышенного онкогенеза было актуальным рассмотреть взаимосвязь процессов апоптоза и канцерогенеза, общие механизмы которых были показаны многократно у людей и лабораторных животных [15, 16]. Так, известно, что процессы роста опухоли, как правило, сопровождаются интенсивной клеточной пролиферацией в сочетании со снижением интенсивности апоптоза, что в совокупности приводит к нарушению тканевого гомеостаза [17]. При депрессии существует повышенная вероятность развития опухоли [18, 19], о чем свидетельствуют также и наши данные, полученные на депрессивных животных в сравнении с контрольным состоянием. Показано, что хронический социальный стресс может стимулировать процессы апоптоза, в частности в головном мозге (например, вызывать гибель нейронов в гиппокампе и миндалине) [20, 21]. Тем важнее исследовать молекулярные механизмы, связывающие хронический социальный стресс, апоптоз и канцерогенез.

Поскольку многократно было показано нами, что хронический социальный стресс вызывает специфические изменения экспрессии генов в мозге [22–28], было высказано пред-

положение, что различный уровень метастазирования у животных с альтернативным социальным опытом может быть как следствием различий в периферической регуляции иммунных процессов, так и возникать на геномном уровне в мозге.

В качестве отдела мозга для изучения взаимоотношений патофизиологических взаимосвязей хронического социального стресса, канцерогенеза и апоптоза интерес представляет гипоталамус, вовлечённый как в нервную, так и в гуморальную регуляцию поведения, а также в иммунные процессы [29]. Предполагается, что участие гипоталамуса в механизмах развития депрессии может осуществляться на разных уровнях [30]. Дискуссия о роли нейровоспаления в этом отделе мозга при депрессии идёт уже в течение многих лет, и современные данные подтверждают их взаимосвязь [29]. Кроме того, известно, что нарушения в функционировании гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы наблюдаются при онкологических заболеваниях [31], сопровождающихся изменением процессов апоптоза нейронов в гипоталамусе [32]. Показано также, что полиморфизм по некоторым гипоталамическим генам связан с повышенным риском депрессии [33]. Очевидно, что гипоталамус можно рассматривать в качестве отдела мозга, в котором происходит пересечение патофизиологических механизмов психоэмоциональных расстройств и связанных с ними иммунных нарушений, и онкологических заболеваний.

Целью данной работы было выявление изменений в профиле экспрессии генов, ассоциированных с канцерогенезом и апоптозом, в гипоталамусе депрессивных самцов мышей со сниженным под влиянием хронического социального стресса иммунным статусом [10] в

сравнительном аспекте с агрессивными самцами с позитивным опытом в агонистических взаимодействиях и с интактным контролем. Выявление геномных механизмов, лежащих в основе коморбидности психоэмоциональных расстройств, онкологических заболеваний и иммунного статуса, может помочь найти новые эффективные фармакологические мишени для более успешной терапии этих заболеваний. Исследование проводилось в рамках развиваемого коллективом направления «Функциональная нейрогеномика патологических состояний».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 2,5 мес. с массой тела 26–28 г. Животные были привезены из Питомника лабораторных животных Института биоорганической химии РАН (Пушино, Московская область). Эксперимент был проведён в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животные имели постоянный неограниченный доступ к корму (гранулам) и воде и содержались при 12-часовом цикле свет/темнота.

**Формирование патологий поведения у самцов мышей.** Хронический социальный стресс у мышей формировали с применением модели сенсорного контакта [34], переименованной в последующем в модель хронического социального конфликта [35]. Методика подробно описана в статьях и обзоре Kudryavtseva et al. [36]. В ежедневных агонистических взаимодействиях животные приобретали альтернативный опыт социального поведения – позитивный опыт побед в агонистических взаимодействиях и хронический негативный опыт социальных поражений с агрессивным партнёром.

Для этого животных попарно помещали в экспериментальные клетки (28 × 14 × 10 см), разделённые пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (14:00–17:00 ч) убирали перегородку на 10 минут, что приводило к межсамцовым конфронтациям. Во время первых 2–3 дней в поведенческих тестах выявляли победителей и особей, терпящих поражения при взаимодействии с одним и тем же партнёром. В дальнейшем ежедневно после теста побеждённого самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнёру, сидяще-

му за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились не более трёх минут и меньше, устанавливая между ними перегородку и предотвращая физическое повреждение самцов, терпящих поражение.

Для нейрогеномных исследований отбирали животных с наиболее выраженным фенотипом поведения, сформированным в ежедневных агонистических взаимодействиях. В эксперименте были исследованы три группы животных: 1) депрессивные самцы, потерпевшие социальные поражения в течение 20 дней, у которых под влиянием хронического социального стресса развивается смешанное тревожно/депрессивное расстройство с признаками выраженного депрессивноподобного состояния, а также тревоги и страха, оцениваемое многими поведенческими тестами [1–3]; 2) агрессивные самцы с повторным опытом агрессии в течение 20 дней, которые демонстрировали ежедневно гиперактивность и повышенную агрессивность, не поддающуюся коррекции ситуационными факторами [36]; 3) контрольные животные – особи без последовательного опыта агонистических взаимодействий. Животные экспериментальных групп были декапитированы на следующий день после последней конфронтации одновременно с контрольными особями. Гипоталамус извлекали в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>). Все образцы помещали в раствор RNAlater («Life Technologies», США) и хранили при температуре –70 °С до секвенирования.

**RNA-Seq-анализ.** Образцы гипоталамуса самцов мышей были отправлены в ЦКП «Геноаналитика» для секвенирования транскриптома (<http://genoanalytica.ru/>, Москва, Россия). В каждой группе было проанализировано по 3 животных. Все образцы секвенировали отдельно. При анализе использовали более 20 млн прочтений ДНК. мРНК экстрагировали с использованием Dynabeads RNA Purification Kit («Ambion», США). Секвенирование библиотек кДНК было выполнено на платформе Illumina HiSeq 1500 («Illumina Sequencing», США). Программа Cufflinks была использована для оценки уровня экспрессии генов в единицах FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads). Более 30 000 генов были проанализированы. Только аннотированные гены были взяты для последующего анализа.

Дифференциально экспрессирующимися считали гены, уровень экспрессии которых статистически значимо различался у контроль-

ных и подопытных мышей ( $p < 0,05$ ). Решение о статистически значимых различиях экспрессии принималось также с использованием поправки на множественные сравнения ( $q$ -значения – скорректированные  $p$ -значения по методу Беньямини–Хохберга (FDR)). Для биоинформатической обработки исследуемого массива транскриптомных данных был использован также корреляционный анализ.

Была проанализирована экспрессия генов, ассоциируемых с механизмами апоптоза и канцерогенеза. Гены для анализа были отобраны с использованием баз данных, связанных с процессами клеточной гибели (<http://deathbase.org>; <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/apocand/browse.php>), а также по литературным данным (табл. 1; табл. 1 в Приложении). Для исследования были взяты только гены, экспрессия которых была изменена в гипоталамусе у агрессивных и/или депрессивных животных по отношению к контрольному состоянию.

Категории генных онтологий списков дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) определяли с использованием биоинформатического интернет-ресурса DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Анализ функций генов, а также биологических процессов, ассоциируемых с этими генами, проводили при помощи базы данных KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) и GeneCard (<https://www.genecards.org>). Для выделения кластеров ДЭГ, позволяющих оценить взаимосвязь нейрогенных процессов у экспериментальных групп по отношению к контролю, была применена программа XLStat (<https://www.xlstat.com>).

**Поиск аналогов генов, ассоциируемых с канцерогенезом и апоптозом, вовлечённых в развитие карциномы лёгких у людей (по литературным данным).** С целью поиска возможных периферических маркеров изменённой экспрессии генов канцерогенеза и апоптоза в гипоталамусе у агрессивных и депрессивных мышей был проведён сравнительный анализ состояния генов у больных раком лёгких с использованием баз данных по человеку ([www.malacards.org/card/lung\\_cancer?search=lung%20cancer%20genes](http://www.malacards.org/card/lung_cancer?search=lung%20cancer%20genes)), а также генов, изменивших экспрессию в лёгких у больных легочной карциномой ([www.malacards.org/search/results?query=lung+cancer+metastasis+gene](http://www.malacards.org/search/results?query=lung+cancer+metastasis+gene)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Были исследованы ДЭГ, ассоциируемые с механизмами апоптоза и канцерогенеза в ги-

поталамусе депрессивных и агрессивных мышей с использованием базы данных (<http://deathbase.org>; <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/apocand/browse.php>). Были отобраны 230 генов для анализа. У агрессивных самцов (табл. 1; табл. 1 в Приложении) под влиянием позитивного социального опыта в агонистических взаимодействиях у 40 генов изменялась экспрессия по отношению к контролю, из них увеличение экспрессии отмечали у 27 генов (68,5%), снижение – у 13 генов (32,5%). У депрессивных животных под влиянием хронического социального стресса экспрессия была изменена у 62 генов, из них у 38 генов (61%) она была повышена по отношению к контролю, у 24 генов (39%) – снижена.

Общими для обеих экспериментальных групп являются 36 ДЭГ (табл. 1; табл. 1 в Приложении) с однонаправленным изменением показателей ФРКМ. Из них у 26 генов экспрессия была увеличена, у 10 – снижена. Исключением были гены *Casp2*, *Foxp2*, *Opa1* и *Tnfrsf22*, уровень экспрессии которых отличается от контрольного только у агрессивных животных. Экспрессия гена *Casp2* возрастает, в то время как генов *Foxp2*, *Opa1* и *Tnfrsf22* – снижается.

Проведён анализ по выявлению ДЭГ, изменивших экспрессию только у депрессивных самцов мышей. Для этого были выделены 34 ДЭГ с изменённой экспрессией при статистическом уровне значимости  $q < 0,05$  у депрессивных животных и  $p < 0,05$  – у агрессивных, отличающиеся по показателям ФРКМ от контрольных животных (табл. 2 в Приложении). Оказалось, что только у 13 генов специфически была изменена экспрессия у депрессивных самцов: из них у четырёх генов экспрессия повышалась (*Akt2*, *Cldn5*, *Nos3* и *Siva1*), а у 9 – снижалась (*Aifm1*, *Anxa1*, *Casp8*, *Fastkd2*, *Mcl1*, *Nol4*, *Pycard*, *Sfrp1* и *Stk17b*). При этом большинство генов со сниженной экспрессией вовлечены в механизмы апоптоза. Таким образом, на фоне снижения экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциируемые с апоптозом, может происходить усиление канцерогенеза, что и было показано у депрессивных животных.

В то же время было выделено 26 генов, экспрессия которых была изменена у депрессивных, но оставалась неизменной у агрессивных самцов по отношению к контролю: *Aifm1*, *Akt2*, *Akt2*, *Anxa1*, *Bcl2l13*, *Bnip3*, *Casp8*, *Ccar1*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Cyld*, *Dpf2*, *Fastkd2*, *Mcl1*, *Nol3*, *Nol4*, *Nomo1*, *Nos1*, *Nos3*, *Pdcd5*, *Ppargc1b*, *Pycard*, *Sfrp1*, *Siva1*, *Stk17b* и *Tnfrsf8* (табл. 1). Из них у 12 генов экспрессия повышалась (*Akt2*, *Akt2*, *Bcl2l13*, *Cldn5*, *Dpf2*, *Nol3*, *Nomo1*, *Nos1*, *Nos3*, *Ppargc1b*, *Siva1* и *Tnfrsf8*), а у 14 – снижалась (*Aifm1*, *Anxa1*,

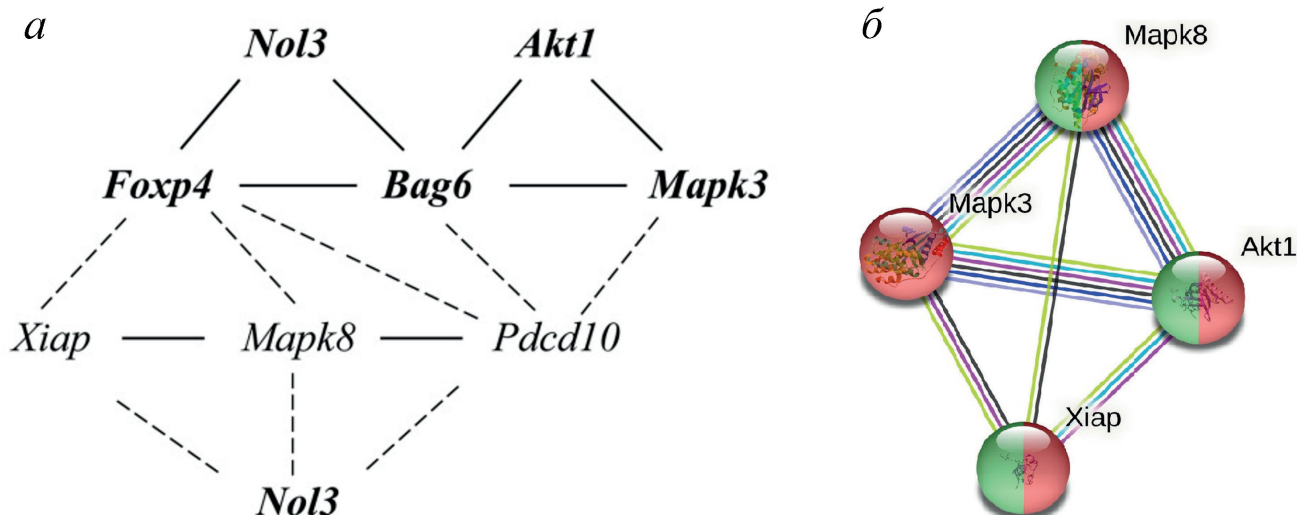


*Bnip3, Casp8, Ccar1, Cldn12, Cyld, Fastkd2, Mcl1, Nol4, Pcdcd5, Pycard, Sfrp1* и *Stk17b*). При этом большинство генов вовлечены в механизмы апоптоза (табл. 1 в Приложении).

**Таблица 1.** ДЭГ, ассоциируемые с канцерогенезом и апоптозом в гипоталамусе самцов мышей с альтернативным социальным опытом

Ген	К vs А	К vs Д	А vs Д	Ген	К vs А	К vs Д	А vs Д
<i>Aifm1</i>	=	↓↓*		<i>Hrk</i>	↑	↑	
<i>Ak2</i>	=	↑		<i>Mapk1</i>	↓↓	↓↓*	
<i>Akt1</i>	↑	↑↑↑*		<i>Mapk3</i>	↑↑	↑↑↑*	↑
<i>Akt2</i>	=	↑↑*		<i>Mapk8</i>	↓	↓↓*	
<i>Alkbh7</i>	↑	↑↑↑*	↑↑	<i>Mcl1</i>	=	↓↓*	
<i>Anxa1</i>	=	↓↓*	↓↓↓	<i>Nfkbib</i>	↑↑	↑↑↑*	
<i>Arc</i>	↑↑	↑↑↑*	↑↑↑*	<i>Nol3</i>	=	↑	
<i>Avp</i>	↑↑↑*	↑↑↑*		<i>Nol4</i>	=	↓↓*	
<i>Avpi1</i>	↑	↑		<i>Nol8</i>	↓	↓↓↓*	
<i>Bag3</i>	↑↑↑*	↑↑↑*		<i>Nomo1</i>	=	↑	
<i>Bag6</i>	↑↑	↑↑↑*		<i>Nos1</i>	=	↑	
<i>Bax</i>	↑↑	↑↑↑*	↑	<i>Nos3</i>	=	↑↑*	
<i>Bbc3</i>	↑	↑		<i>Nosip</i>	↑	↑↑↑*	↑
<i>Bcl2l1</i>	↑↑	↑↑↑*		<i>Opa1</i>	↓	=	
<i>Bcl2l13</i>	=	↑		<i>Pcdcd5</i>	=	↓	
<i>Bnip3</i>	=	↓		<i>Pcdcd10</i>	↓↓*	↓↓↓*	
<i>Bok</i>	↑↑*	↑↑↑*		<i>Pomc</i>	↑↑↑*	↑↑↑*	
<i>Casp2</i>	↑	=	↓	<i>Ppargc1b</i>	=	↑	
<i>Casp8</i>	=	↓↓*	↓↓	<i>Pycard</i>	=	↓↓*	↓↓
<i>Casp8ap2</i>	↓↓↓*	↓↓↓*		<i>Sfrp1</i>	=	↓↓↓*	
<i>Ccar1</i>	=	↓		<i>Sfrp5</i>	↑↑↑*	↑↑↑*	
<i>Cldn5</i>	=	↑↑*		<i>Sh3glb1</i>	↓	↓	
<i>Cldn12</i>	=	↓		<i>Siva1</i>	=	↑↑*	
<i>Clip3</i>	↑	↑↑*		<i>Stk3</i>	↓↓	↓↓*	
<i>Cyld</i>	=	↓		<i>Stk17b</i>	=	↓↓*	↓
<i>Dpf1</i>	↑↑	↑↑↑*		<i>Stk19</i>	↑	↑↑↑*	
<i>Dpf2</i>	=	↑		<i>Stk39</i>	↓↓*	↓↓*	
<i>Fasn</i>	↑↑↑*	↑↑↑*		<i>Tnfaip8</i>	↓	↓	
<i>Fastk</i>	↑	↑↑↑*		<i>Tnfrrsf1a</i>	↑↑	↑	
<i>Fastkd2</i>	=	↓↓*		<i>Tnfrrsf8</i>	=	↑	
<i>Foxp2</i>	↓	=		<i>Tnfrrsf22</i>	↓	=	
<i>Foxp4</i>	↑↑↑*	↑↑↑*		<i>Tnfrrsf25</i>	↑↑↑*	↑↑↑*	
<i>Gapdh</i>	↑↑	↑↑↑*		<i>Xiap</i>	↓↓↓*	↓↓↓*	

Примечание. К – контроль; А – агрессивные мыши; Д – депрессивные мыши. ↓ – Снижение экспрессии; ↑ – увеличение экспрессии; = – экспрессия не изменена; ↓  $p < 0,05$ ; ↓↓  $p < 0,01$ ; ↓↓↓  $p < 0,001$ ; ↑  $p < 0,05$ ; ↑↑  $p < 0,01$ ; ↑↑↑  $p < 0,001$ ; \*  $q < 0,05$ .



**Рис. 2.** Корреляционные взаимосвязи функциональной активности ДЭГ. *а* – Пунктирная линия – отрицательная взаимосвязь; сплошная линия – положительная взаимосвязь; обычным шрифтом обозначено снижение экспрессии у конкретного гена; жирным шрифтом – повышение экспрессии. Ген *Nol3* представлен на рисунке дважды для удобства представления. *б* – Наибольшее число взаимосвязей, согласно базе данных String (string-db.org), было установлено для генов *Akt1*, *Mapk3*, *Mapk8* и *Xiap*

Также было проведено сравнение выраженности экспрессии генов у агрессивных и депрессивных мышей (табл. 1 в Приложении) по отношению друг к другу. Различия по этому показателю были обнаружены у 10 ДЭГ. По сравнению с агрессивными животными, у депрессивных самцов гены *Arc*, *Vax* и *Nosip*, кодирующие регуляторные молекулы, и гены *Alkbh7* и *Mapk3*, кодирующие белки-ферменты, демонстрируют повышенный уровень экспрессии; а гены *Casp2*, *Casp8* и *Stk17b*, кодирующие белки-ферменты, а также *Anxa1*, кодирующий регуляторный белок, и *Pycard*, кодирующий транскрипционный фактор, – пониженный.

**Корреляционный анализ.** В табл. 3 в Приложении приведено общее число корреляционных зависимостей между ДЭГ у трёх групп – контроль, агрессивные и депрессивные самцы. Для дальнейшего рассмотрения были отображены гены *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pcd10* и *Xiap*, для которых было показано максимальное количество корреляций с другими генами (при  $r \geq 0,95$  и  $r \leq -0,95$ ). Эти гены в дальнейшем анализе рассматривались в качестве возможных кандидатов на роль координирующих генов, участвующих в формировании психосоматических патологий под влиянием хронического социального конфликта. В табл. 2 представлены ДЭГ, имеющие хотя бы одну корреляцию с одним из высоко коррелирующих генов. Кроме того, на рис. 2 можно видеть, что выделяются 2 группы координирующих генов: *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3* и *Nol3*, экспрессия которых была увеличена; и *Mapk8*, *Pcd10*, *Xiap*, экспрессия которых снижалась. Гены каждой

группы коррелируют между собой положительно. Между уровнями экспрессии генов, относящихся к разным кластерам, наблюдается отрицательная корреляция. Показаны отрицательные корреляции с генами *Mapk8*, *Xiap* и *Pcd10* и положительные – с *Foxp4* и *Bag6*.

**Агломеративная иерархическая кластеризация ДЭГ.** Был проведён анализ по визуализации иерархической кластеризации ДЭГ в группах агрессивных и депрессивных мышей в сравнительном аспекте с контрольной группой. В результате анализа данных по депрессивным животным были выделены 3 кластера (рис. 3; табл. 4 в Приложении), включающие кластер из 24 ДЭГ со сниженной экспрессией и 2 кластера генов, экспрессия которых повышалась (34 и 4 гена). В кластер генов со сниженной экспрессией попадают *Pcd10*, *Mapk8* и *Xiap*, которые могут рассматриваться как координирующие взаимодействие других генов. В кластер с генами, у которых экспрессия повышалась, попадают *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3* и *Nol3*, и, что характерно, все они относятся к одному кластеру из двух (большему).

У агрессивных животных были также выделены 3 кластера (рис. 4; табл. 4 в Приложении), включающие кластер из 27 генов с повышенной экспрессией и 2 кластера, экспрессия у которых снижалась – 4 и 9 ДЭГ. Что касается «координирующих» генов, то здесь наблюдается то же, что и у депрессивных животных: *Pcd10*, *Mapk8* и *Xiap* попадают в один кластер снизивших экспрессию ДЭГ. В кластер с увеличившими экспрессию генами попадают *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4* и *Mapk3*.

**Таблица 2.** Коэффициенты корреляций между экспрессией генов, кодирующие белки, вовлечённые в координацию механизмов канцерогенеза и апоптоза

	<i>Akt1</i>	<i>Bag6</i>	<i>Foxp4</i>	<i>Mapk3</i>	<i>Mapk8</i>	<i>Nol3</i>	<i>Pcd10</i>	<i>Xiap</i>
<i>Akt1</i>	<b>1,000</b>	<b>0,958</b>	<b>0,896</b>	<b>0,975</b>	-0,844	0,864	<b>-0,944</b>	-0,864
<i>Alkbh7</i>	<b>0,982</b>	<b>0,952</b>	0,883	<b>0,956</b>	-0,838	0,870	<b>-0,915</b>	-0,853
<i>Avp1</i>	0,844	0,876	<b>0,954</b>	0,849	-0,871	<b>0,888</b>	<b>-0,908</b>	-0,865
<i>Bag3</i>	0,872	<b>0,930</b>	<b>0,957</b>	<b>0,935</b>	<b>-0,963</b>	<b>0,926</b>	<b>-0,970</b>	<b>-0,950</b>
<i>Bag6</i>	<b>0,958</b>	<b>1,000</b>	<b>0,961</b>	<b>0,983</b>	<b>-0,930</b>	<b>0,954</b>	<b>-0,988</b>	<b>-0,918</b>
<i>Bax</i>	<b>0,919</b>	<b>0,928</b>	0,874	<b>0,958</b>	<b>-0,908</b>	0,864	<b>-0,931</b>	<b>-0,905</b>
<i>Bcl2l1</i>	<b>0,966</b>	<b>0,940</b>	0,864	<b>0,952</b>	-0,814	0,825	<b>-0,942</b>	-0,839
<i>Cldn12</i>	-0,803	<b>-0,886</b>	<b>-0,944</b>	<b>-0,896</b>	<b>0,985</b>	<b>-0,952</b>	<b>0,913</b>	<b>0,955</b>
<i>Clip3</i>	0,842	<b>0,925</b>	<b>0,985</b>	<b>0,916</b>	<b>-0,968</b>	<b>0,982</b>	<b>-0,956</b>	<b>-0,945</b>
<i>Cyld</i>	-0,850	<b>-0,901</b>	<b>-0,930</b>	<b>-0,932</b>	<b>0,979</b>	<b>-0,945</b>	<b>0,920</b>	<b>0,981</b>
<i>Dpf1</i>	0,884	<b>0,928</b>	<b>0,929</b>	<b>0,893</b>	-0,857	0,868	<b>-0,950</b>	-0,818
<i>Fasn</i>	<b>0,979</b>	<b>0,937</b>	0,835	<b>0,949</b>	<b>-0,786</b>	0,819	<b>-0,907</b>	-0,824
<i>Foxp4</i>	<b>0,896</b>	<b>0,961</b>	<b>1,000</b>	<b>0,942</b>	<b>-0,966</b>	<b>0,982</b>	<b>-0,977</b>	<b>-0,953</b>
<i>Mapk1</i>	-0,858	<b>-0,901</b>	<b>-0,935</b>	<b>-0,930</b>	<b>0,960</b>	<b>-0,923</b>	<b>0,940</b>	<b>0,980</b>
<i>Mapk3</i>	<b>0,975</b>	<b>0,983</b>	<b>0,942</b>	<b>1,000</b>	<b>-0,930</b>	<b>0,934</b>	<b>-0,981</b>	<b>-0,930</b>
<i>Mapk8</i>	-0,844	<b>-0,930</b>	<b>-0,966</b>	<b>-0,930</b>	<b>1,000</b>	<b>-0,971</b>	<b>0,950</b>	<b>0,973</b>
<i>Nfkbib</i>	<b>0,952</b>	<b>0,989</b>	<b>0,959</b>	<b>0,967</b>	<b>-0,921</b>	<b>0,938</b>	<b>-0,980</b>	<b>-0,930</b>
<i>Nol3</i>	0,864	<b>0,954</b>	<b>0,982</b>	<b>0,934</b>	<b>-0,971</b>	<b>1,000</b>	<b>-0,957</b>	<b>-0,955</b>
<i>Nomo1</i>	<b>0,967</b>	<b>0,959</b>	<b>0,916</b>	<b>0,977</b>	<b>-0,891</b>	<b>0,917</b>	<b>-0,943</b>	-0,883
<i>Nosip</i>	<b>0,977</b>	<b>0,982</b>	<b>0,945</b>	<b>0,990</b>	<b>-0,922</b>	<b>0,936</b>	<b>-0,969</b>	<b>-0,918</b>
<i>Pcd10</i>	<b>-0,944</b>	<b>-0,988</b>	<b>-0,977</b>	<b>-0,981</b>	<b>0,950</b>	<b>-0,957</b>	<b>1,000</b>	<b>0,936</b>
<i>Tnfaip8</i>	-0,856	<b>-0,913</b>	<b>-0,940</b>	<b>-0,928</b>	<b>0,959</b>	<b>-0,960</b>	<b>0,806</b>	<b>0,991</b>
<i>Tnfrsf25</i>	<b>0,898</b>	<b>0,937</b>	<b>0,925</b>	<b>0,953</b>	<b>-0,947</b>	<b>0,941</b>	<b>0,248</b>	<b>-0,983</b>
<i>Xiap</i>	-0,864	<b>-0,918</b>	<b>-0,953</b>	<b>-0,930</b>	<b>0,973</b>	<b>-0,955</b>	<b>0,936</b>	<b>1,000</b>

Примечание. Жирным шрифтом выделены корреляции с уровнем статистической значимости  $p \leq 0,001$ . Светло-серым выделены отрицательные корреляции при  $r \leq -0,950$ , темно-серым – положительные при  $r \geq 0,950$ .

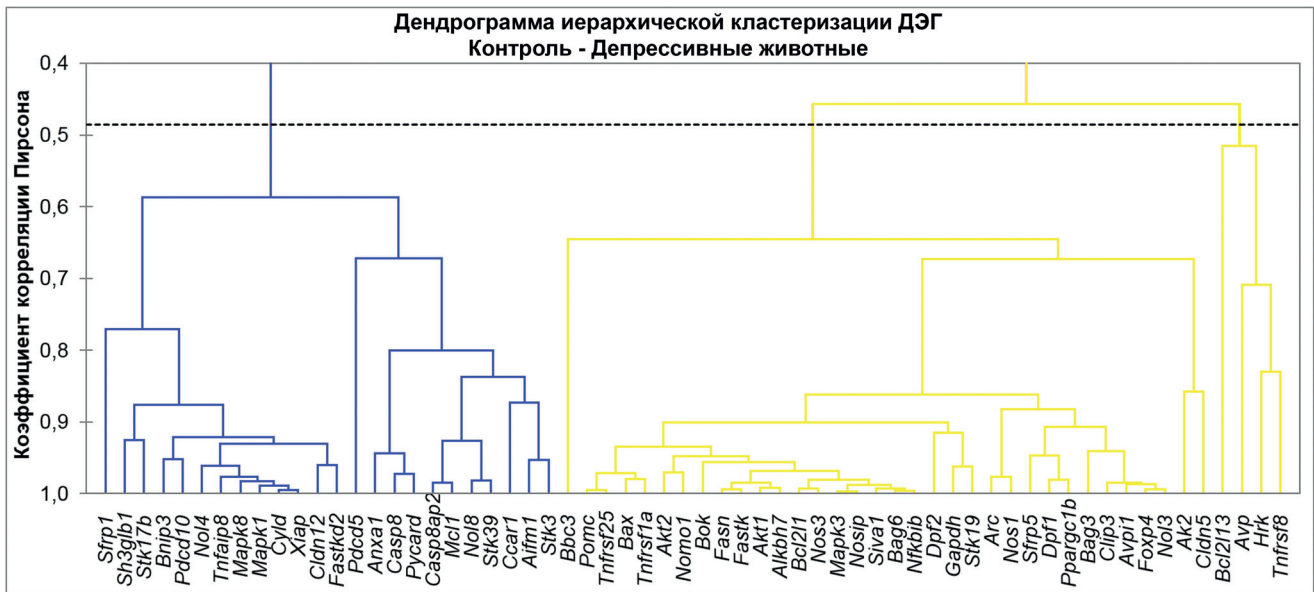


Рис. 3. Дендрограмма иерархической кластеризации ДЭГ в гипоталамусе депрессивных самцов. Темно-серым цветом выделены гены со сниженной экспрессией, светло-серым цветом — гены с повышенной экспрессией

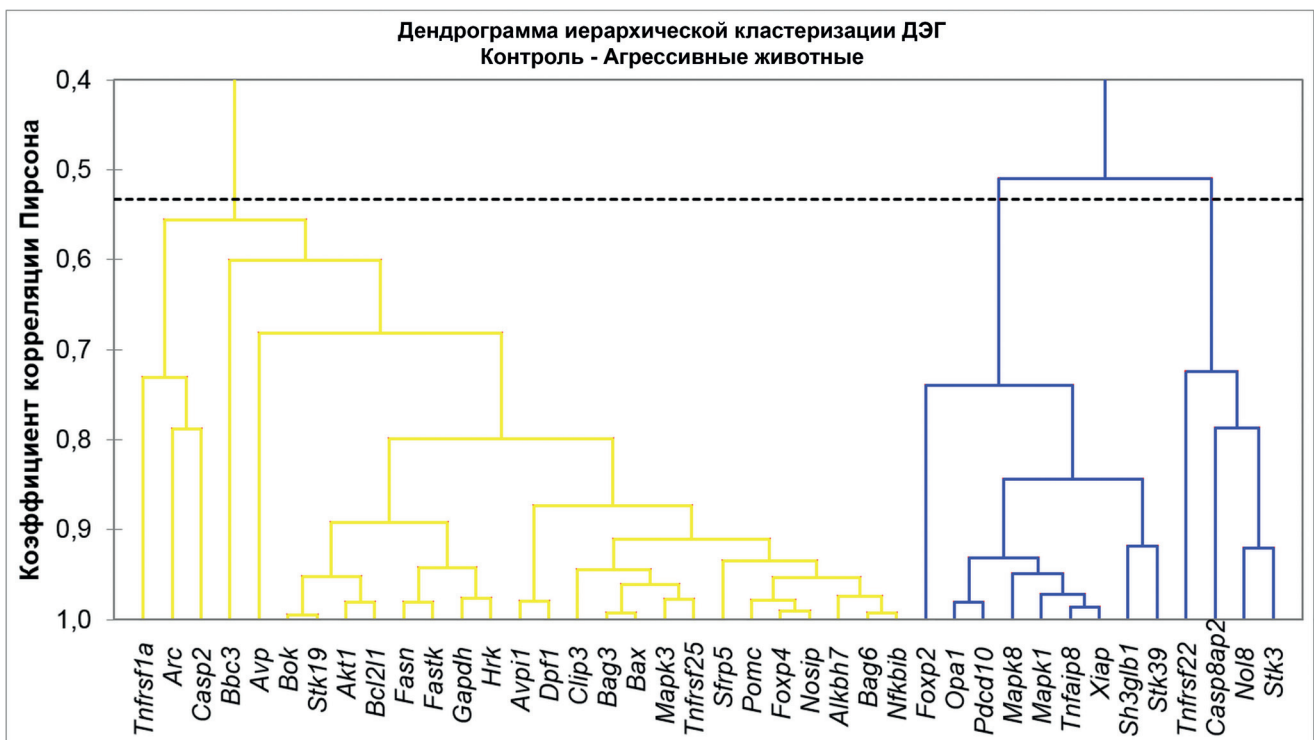


Рис. 4. Дендрограмма иерархической кластеризации ДЭГ в гипоталамусе агрессивных самцов. Темно-серым цветом выделены гены со сниженной экспрессией, светло-серым цветом — гены с повышенной экспрессией

Согласно связям, представленным на дендрограммах, среди ДЭГ, предполагаемых в качестве координирующих, существует несколько возможных взаимоотношений. Так, например, ген *Akt1* кластеризуется с геном *Bcl2l1* у агрессивных и депрессивных животных и с геном *Alkbh7* — у депрессивных мышей; *Foxp4* кластеризуется с геном *Nosip* у агрессивных самцов и с геном *Avp1* — у депрессивных жи-

вотных; ген *Mapk3* — с геном *Tnfrsf25* (у агрессивных самцов) и с геном *Nosip* (у депрессивных животных); ген *Pdcd10* — с *Opa1* (у агрессивных самцов) и с геном *Bnip3* (у депрессивных самцов). В то же время ген *Bag6* тесно взаимосвязан с геном *Nfkbib* у обеих групп животных; а ген *Mapk8* — с генами *Mapk1*, *Tnfrsf8*, и *Xiap* (у агрессивных самцов) и с генами *Mapk1*, *Cyld* и *Xiap* — у депрессивных самцов.



Предварительный вывод из сопоставлений кластеризации у двух групп экспериментальных животных: экспрессия генов может изменяться в зависимости от нейрогеномного окружения, которое у агрессивных и депрессивных самцов по многим показателям различается.

**ДЭГ, вовлечённые в метаболические пути, согласно базе данных KEGG.** С использованием базы данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) были выделены метаболические пути, в работе которых принимают участие ДЭГ, выявленные в нашем исследовании: 2 гена кодируют сигнальные молекулы, 5 генов являются транскрипционными факторами, 22 ДЭГ кодируют белки-ферменты. Самой многочисленной является группа генов (29 ДЭГ), кодирующих регуляторные белки, вовлечённые в различные внутриклеточные процессы (табл. 5 в Приложении).

Все метаболические пути связаны с механизмами канцерогенеза и апоптоза либо с заболеваниями, в патогенез которых входят эти процессы как в периферических органах, так и в головном мозге. В частности, пути, связанные с развитием паразитарных и инфекционных заболеваний, таких как токсоплазмоз, легионеллёз, туберкулёз, при которых отмечается повышенная клеточная гибель в поражённых органах. Также обнаружены метаболические пути заболеваний, чья основная патология вызывается именно апоптозными процессами, как в случае амиотрофического латерального склероза, неалкогольных повреждений печени или болезни Альцгеймера. Исследуемые гены вовлечены также в функционирование сигнальных путей, регулирующих апоптоз – p53, NF-каппа В, сфинголипидный сигнальный путь. Участие ДЭГ в процессах, связанных не только с апоптозом, наиболее часто выявляется для генов *Aifm1*, *Akt1*, *Akt2*, *Bax*, *Bcl2l1*, *Casp2*, *Casp8*, *Cyld*, *Cldn5*, *Hrk*, *Mapk1*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nos3*, *Nfkb1b*, *Pycard*, *Pomc*, *Tnfrsf1a*, *Xiap* и др. (табл. 5 в Приложении).

Наибольший уровень экспрессии (> 40–50 ФРКМ) показан для генов *Akt* (50,2), *Alkph7* (47,4), *Ayp* (439,9), *Vag6* (53,9), *Clip3* (153,5), *Gapdh* (320,6), *Mapk1* (57,95), *Mapk3* (69,8), *Pdcd5* (68,6), *Pomc* (61,6) (табл. 1 в Приложении).

**Сравнительный анализ генов, ассоциированных с канцерогенезом и апоптозом в гипоталамусе депрессивных животных, и состояния генов у больных с лёгочной карциномой (по литературным данным).** С использованием баз данных по человеку ([www.malacards.org/](http://www.malacards.org/)) было исследовано изменённое состояние генов в разных тканях, а также непосредственно в лёгких у больных с лёгочной карциномой. У людей к генам, ассоциируемым с раком лёгких, согласно базе

данных (MGI Mouse Phenotypes related to Lung Cancer), относятся около 216 генов, среди которых были отобраны для анализа топ-гены с неоднократно подтверждёнными результатами: *Akt1*, *Alk*, *Braf*, *Casp8*, *Cyp2a6*, *Egfr*, *ErbB2*, *Ercc6*, *Faslg*, *Kras*, *Irf1*, *Pik3ca*, *Prkn* и *Slc22a18* для сравнительного анализа с ДЭГ, обнаруженными в гипоталамусе мыши.

Среди ДЭГ в гипоталамусе депрессивных животных были найдены сходные гены (табл. 6 в Приложении) семейств *Akt* (*Akt1*, *Akt2*, *Akt1s1*), *Alkb* (*Alkbh7*), *Casp* (*Casp2*, *Casp8*, *Casp8ap2*), *Irf2bp* (*Irf2bpl*, *Irf2bp1*, *Irf5*, *Irf9*), *Ercc* (*Ercc1*, *Ercc2*, *Ercc4*), а также гены *Braf*, *Pik3ca* и *ErbB2i*. У агрессивных животных была обнаружена аналогичная тенденция, однако количество генов было меньшим: *Akt1*, *Akt1s1*, *Aqp4*, *Braf*, *Casp8ap2*, *ErbB2ip*, *Irf1*, *Irf2bpl*, *Irf2bp1* и *Kras*.

Кроме того, по сравнению с тканью здоровых лёгких у пациентов с диагнозом рак лёгких (Lung cancer) в лёгочной ткани были обнаружены в числе топ 10 ДЭГ – *Adh1b*, *Ager*, *Aqp4*, *Cldn18*, *Clic5*, *Cyp4b1*, *Krt6a*, *Mmp12*, *Sftpc* и *Spr1b*. Дифференциальная экспрессия сходных генов была обнаружена и у депрессивных животных в гипоталамусе – *Ager*, *Aqp4*, *Cyp4a14*, семейств *Cldn* (*Cldn5*, *Cldn12*), *Clic* (*Clic1*, *Clic5*) и *Mmp* (*Mmp15*, *Mmp17*). У агрессивных животных это были гены семейств *Clic* (*Clic5*, *Clic6*), *Cyp* (*Cyp4a15*, *Cyp46a1*) и *Mmp* (*Mmp16*, *Mmp17*), а также *Adh5*, *Aqp4*, *Cldn9*, *Krtcap2* и *Krt9* (табл. 6 в Приложении). Все эти данные могут свидетельствовать о том, что в мозге, в частности в гипоталамусе, изменения экспрессии генов под влиянием хронического социального стресса могут в той или иной степени соответствовать изменениям в периферических тканях. Однако этот вывод нуждается в экспериментальном подтверждении.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что хронический стресс различной этиологии может вызывать апоптоз в культурах клеток гипоталамуса [37, 38]. Полученные нами данные также позволяют предположить, что хронический социальный стресс может быть причиной изменения экспрессии генов, ассоциируемых с апоптозом и канцерогенезом в гипоталамусе у животных, вступающих в конфликтные взаимодействия. При этом у самцов с негативным социальным опытом, сопровождающимся развитием депрессивноподобного состояния [1], показаны изменения экспрессии большего числа генов,

чем у агрессивных самцов с позитивным социальным опытом. Характерно, что подобная тенденция была выявлена и для других отделов мозга и других групп генов, например, кодирующих белки, участвующие в работе нейромедиаторных систем, митохондриальных, коллагеновых, рибосомальных генов и др. [22–28, 39].

Показано, что, за исключением генов *Tnfrsf22*, *Foxp2*, *Opa1* и *Casp2*, экспрессия которых изменялась только под влиянием повторного опыта агрессии, у всех других генов экспрессия была изменена в гипоталамусе у обеих групп одинаково, не отличаясь по большинству ДЭГ. В то же время были обнаружены значимые отличия в уровне экспрессии генов *Alkbh7*, *Anxa1*, *Arc*, *Bax*, *Casp2*, *Casp8*, *Mapk3*, *Nosip*, *Pycard* и *Sik17b* между экспериментальными группами, что позволяет предположить их возможную роль в развитии более интенсивных процессов канцерогенеза у депрессивных животных.

Однако необходимо обратить внимание также на те гены, экспрессия которых не изменялась у агрессивных животных, но изменялась у депрессивных. Среди них присутствуют общепризнанные семейства генов, для которых неоднократно было подтверждено участие в процессах канцерогенеза и/или апоптоза. Так, известно, что каспаза, белок, кодируемый геном *Casp8*, является инициатором запуска апоптоза по внутреннему механизму и некроптоза, в то время как недостаток этого фермента приводит к воспалительным процессам [40]. Проапоптотная активность показана для белка, кодируемого геном *Scar1*, являющегося стимулятором супрессора опухолей p53 [41]. Для белка синтазы оксида азота, кодируемого геном *Nos1*, наоборот характерна антиапоптотная активность [42]. Как об антиапоптотных агентах, говорят также и о белках, кодируемых генами *Mcl1* и *Bcl* [43], хотя есть сведения, что на функционирование *Mcl1* может влиять альтернативный сплайсинг, превращая его то в антиапоптотный, то в проапоптотный агент. Возможно, именно белки, кодируемые этими генами или какими-то из них, оказывают, находясь в изменённом состоянии, стимулирующее влияние на метастазирование опухоли, показанное нами у депрессивных животных в эксперименте [12–14].

Мы проанализировали ДЭГ *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10* и *Xiap*, для которых было показано наибольшее количество корреляций с экспрессией других ДЭГ со значением коэффициента корреляции  $r \geq 0,950$  и  $r \leq -0,950$ , так как предположили, что они могут претендовать на роль генов, в наибольшей степени кодирующих белки, обеспечивающие скоординированность процессов изменения

экспрессии генов канцерогенеза и апоптоза при развитии иммунопатологии и взаимосвязанного с ней канцерогенеза. Так, ген *Akt1* кодирует внутриклеточный фермент, РАС-альфа – серин-треониновую протеинкиназу, для которой показано участие в процессах клеточного роста, пролиферации, а также в процессах ангиогенеза. Киназа АКТ1 вовлечена в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток. Мутации гена *Akt1* обнаружены в случаях рака молочной железы, рака толстой кишки, аденокарциномы лёгкого [44].

Ген *Bag6* кодирует белки, которые положительно регулируют апоптоз, взаимодействуя с проапоптотическим фактором AIFM1 и стабилизируя его. Контролируя устойчивую экспрессию рецептора IGF1R, он косвенно регулирует сигнальный путь рецептора инсулиноподобного фактора роста [45]. Для гена *Foxp4* показана важная роль в развитии раковых заболеваний. Он способствует клеточной пролиферации, миграции, а также инвазии [46]. Также на роль генов-«координаторов» претендуют два представителя семейства *Mapk*, кодирующие митоген-активированные киназы *Mapk3* и *Mapk8*, относящиеся к группе мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и другие процессы. Хотя для гена *Mapk3* более характерно участие в других физиологических процессах и в развитии различных патологических состояний, тем не менее известно, что для многих форм рака отмечено изменение уровня экспрессии этого гена [44]. *Mapk8* традиционно рассматривается в качестве гена, активация которого фактором некроза опухоли способна влиять на апоптоз [47]. В то же время известно, что для белка, кодируемого этим геном, показан и антиапоптотный эффект, приводящий даже к снижению эффективности противоопухолевой терапии [48]. Кроме того, белки, кодируемые этим геном, могут способствовать росту опухоли [49].

Ген *Nol3* кодирует белок, который является общепризнанным ингибитором апоптоза [50]. Ингибирование может происходить как за счёт блокировки каспаз – белков-эффекторов апоптоза, так и за счёт блокировки комплекса DISC (death-inducing signaling complex), индуцирующего апоптоз. Белки, кодируемые геном *Pdcd10*, выполняют большое количество внутриклеточных функций, таких как образование межклеточных сцеплений цитоскелета, экзоцитоз и ангиогенез. Они участвуют также в регуляции сигнальных путей [51]. Известно, что под действием оксидативного стресса белки, коди-

руемые геном *Pdcd10*, взаимодействуют с серин-треониновой киназой STK25, что приводит к активации апоптоза [52]. В то же время известно, что этот ген может участвовать в усилении роста метастазов [53], что обычно связывают со снижением апоптоза. Показана двойная роль этого гена в формировании нечувствительности к противораковой терапии [54].

Антиапоптотный эффект белка, кодируемого геном *Xiap*, установлен давно и подтверждается новейшими исследованиями [55, 56]. Его антиапоптотные свойства используются для разработки более чувствительных методов противораковой терапии, способной вызывать апоптоз только в опухолевых клетках [57]. Полагают, что снижение апоптоза является одной из причин усиления пролиферации клеток, и, следовательно, ведёт к канцерогенезу [58]. Об этом же свидетельствуют наши данные по выявлению генов, у которых специфически была изменена экспрессия только у депрессивных животных.

Таким образом, мы можем предположить, что однонаправленное изменение экспрессии изученных генов у животных с альтернативным социальным опытом в агонистических взаимодействиях является следствием неспецифической реакции на стресс, которому подвержены обе группы экспериментальных животных с большей выраженностью изменений у депрессивных животных. Изменение экспрессии уникальных для депрессивных самцов генов является результатом более жёсткого социального стресса, связанного не только с агонистическими столкновениями, но также с развитием психоэмоционального расстройства. И в то же время неизменяющаяся экспрессия некоторых генов, отмеченная у агрессивных животных со сниженным ростом метастазов, и специфически сниженная экспрессия только у депрессивных самцов может быть свидетельством важной роли этих генов в стимуляции канцерогенеза.

Иерархическая кластеризация ДЭГ в каждой группе агрессивных и депрессивных животных позволяет выдвинуть предположение о зависимости функционирования гена от нейрoхимического окружения, определяемого развитием той или иной патологии в нашем случае в гипоталамусе, которые могут работать по-разному в кооперации с разными генами. Тем не менее эти выводы необходимо подкрепить как теоретически, так и экспериментально.

Полученные нейрогеномные данные, свидетельствующие о возможном снижении апоптоза, как фактора, способствующего усиленному канцерогенезу, могут, на наш взгляд, внести вклад в понимание полученных ранее результатов о выраженном и воспроизводимом влиянии

социального статуса на скорость роста пересаженных первичных опухолей или их естественное метастазирование в лёгких у мышей с негативным и позитивным социальным опытом [12–14, 59, 60].

**Гипотеза, отвечающая на вопрос, но и требующая доказательств.** Неизбежно встаёт вопрос: могут ли обнаруженные нами изменения экспрессии генов канцерогенеза и апоптоза в гипоталамусе у экспериментальных животных отражать некие изменения в периферических тканях и органах и, в частности, в опухолях?

Скорее всего, это возможно, если предположить скоординированность этих процессов в мозге и периферических тканях (например, в лёгких) в том случае, если у генов изменяется экспрессия под влиянием одного и того же фактора, например кортикостероидов, других гормонов или нейротрансмиттеров, выделяющихся в кровь под влиянием какого-либо воздействия, в нашем случае, хронического социального стресса. Это можно было бы подтвердить, проведя одновременно исследование изменений экспрессии генов канцерогенеза и апоптоза в гипоталамусе и в ткани карциномы лёгких с увеличенным числом метастазов. Если так, то эти данные позволили бы найти периферические маркеры изменяющейся экспрессии генов в мозге.

С использованием литературных данных мы провели сравнительный анализ между изменённой экспрессией генов канцерогенеза и апоптоза в гипоталамусе у депрессивных животных и состоянием топ-генов у больных с карциномой лёгких. Данные подробно изложены в разделе «Результаты исследования» (табл. 6 в Приложении). Анализ показал, что по крайней мере гены *Akt1*, *Braf*, *Casp8*, *ErbB2*, *Erc6*, *Irf1*, *Kras* и *Pik3ca*, изменения экспрессии которых отмечены в гипоталамусе у депрессивных животных, участвуют в росте опухоли, а экспрессия генов *Ager*, *Clic5* и *Aqp4* изменена у больных с опухолью лёгких. Эти находки являются косвенным доказательством того, что в головном мозге, в частности в гипоталамусе, изменённая экспрессия генов может в определённой степени соответствовать таким изменениям в периферических тканях. Однако эта гипотеза нуждается в экспериментальном подтверждении.

Кроме этого, очевидно и неоднократно показано, что на рост и метастазирование опухоли может влиять психоэмоциональный статус индивида через модификацию его иммунной реактивности. Имеются многочисленные данные, в том числе полученные во многих наших экспериментах, подтверждающие развитие



психогенного иммунодефицита у депрессивных животных под влиянием хронического социального стресса, влияющего на рост опухолей [4, 6, 7, 10, 61–65]. Таким образом, возможным объяснением повышенного количества метастазов в лёгких у депрессивных мышей в наших экспериментах может быть снижение иммунитета. В этом случае метастазирование опухоли будет меньше у агрессивных животных, для которых предполагается развитие аутоиммунного заболевания, сопровождающегося усилением иммунной реактивности [4, 66, 67]. Однако, маловероятно, что состояние иммунитета является основным фактором, определяющим процессы метастазирования в этих экспериментах.

Можно предположить также, что разная интенсивность метастазирования опухоли у агрессивных и депрессивных мышей может быть следствием различий их нейроэндокринного статуса, так как мозговая деятельность по-разному изменяется под влиянием повторного позитивного и негативного социального опыта в ежедневных агонистических взаимодействиях [10, 35]. Нейротрансмиттеры могут влиять на секрецию гормонов и таким образом приводить к различным изменениям функций надпочечников и андрогенов у самцов мышей с противоположным типом социального поведения. Некоторые нейроэндокринные факторы могут выступать в роли своеобразных факторов роста и модифицировать развитие опухолей и метастазирование как путём прямого действия на опухолевые клетки, так и опосредованно через влияние на сосудистое русло органов-мишеней для метастазирования. Большое количество физиологических особенностей, таких как активность тканевых макрофагов и НК-клеток, проницаемость эндотелиальных капилляров, тонус и скорость васкуляризации и др., которые подвергаются нейроэндокринной регуляции, могут влиять на колонизацию опухолевыми клетками органов-мишеней и частоту метастазов [63, 68–70]. Имеется ряд работ, указывающих на то, что усиленное метастазирование опухоли у депрессивных животных купируется антагонистами рецепторов некоторых нейромедиаторов [71–74]. Наши результаты по фармакологической коррекции эмоционального статуса с помощью анксиолитика диазепама [8, 14, 60] или этанола [59], которые снижали уровень тревожности у депрессивных самцов мышей и при этом предотвращали развитие иммунных нарушений, свидетельствуют о тесной взаимосвязи этих процессов. В то же время активация иммунной системы с помощью хронического введения ронколейкина не влияла на этот процесс [75].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический опыт агонистических взаимодействий вызывает в гипоталамусе изменение экспрессии большого числа генов, кодирующих белки, ассоциируемые с механизмами канцерогенеза и апоптоза, как у животных со смешанным тревожно/депрессивным расстройством, сформированным под влиянием хронического социального стресса, так и у агрессивных животных с повторным позитивным социальным опытом. В результате анализа были выделены гены (*Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10* и *Xiap*), экспрессия которых максимально коррелировала с экспрессией других генов, свидетельствуя о скоординированности нейрогеномных процессов в этом отделе мозга. Эти гены представляют интерес для дальнейшего более подробного изучения с целью разработки методов фармакологической коррекции соматических нарушений, формирующихся под влиянием хронического социального стресса и поиска периферических маркеров нейрогеномных изменений.

**Вклад авторов.** Галямина А.Г., Смагин Д.А., Коваленко И.Л. — проведение экспериментов; Редина О.Е., Бабенко В.Н. — обсуждение результатов исследования; Кудрявцева Н.Н., Галямина А.Г., Смагин Д.А. — написание текста; Кудрявцева Н.Н. — концепция.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-10095).

**Благодарности.** Авторы благодарны ЦКП Геноаналитика (<http://genoanalytica.ru/>, Москва, Россия) за проведение технологической части эксперимента и первичный статистический анализ. Авторы также благодарны Н.А. Шевчуку за коррекцию английской версии манускрипта ([shevchuk-editing.com](http://shevchuk-editing.com)).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes). Применяемые методики для изучения поведения у мышей были одобрены Научной комиссией № 9 Института цитологии и генетики СО РАН (Март, 24, 2010, N 613).

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V., Koryakina, L. A. (1991) Social model of depression in mice of C57BL/6J strain, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **38**, 315-320, doi: 10.1016/0091-3057(91)90284-9.
- Galyamina, A. G., Kovalenko, I. L., Smagin, D. A., and Kudryavtseva, N. N. (2017). Interaction of depression and anxiety in the development of mixed anxiety/depression disorder. Experimental studies of the mechanisms of comorbidity, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **47**, 699-713, doi: 10.1007/s11055-017-0458-3.
- Kudryavtseva, N. N. (2021) Development of mixed anxiety/depression-like state as a consequence of chronic anxiety: review of experimental data, *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, **54**, 125-152, doi: 10.1007/7854\_2021\_248.
- Devoino, L. V., Alperina, E. L., Kudryavtseva, N. N., and Popova, N. K. (1993) Immune responses in male mice with aggressive and submissive behavior patterns: strain differences, *Brain. Behav. Immun.*, **7**, 91-96, doi: 10.1006/brbi.1993.1009.
- Devoino, L., Idova, G., Alperina, E., and Cheido, M. (1994) Brain neuromediator systems in the immune response control: pharmacological analysis of pre- and postsynaptic mechanisms, *Brain Res.*, **633**, 267-274, doi: 10.1016/0006-8993(94)91548-2.
- Попова Н. А., Ильницкая С. И., Колесникова Л. А., Каледин, В. И., Кудрявцева, Н. Н. (1996) Влияние социального конфликта на некоторые параметры неспецифической резистентности у мышей, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **82**, 12-17.
- Тендитник М. В., Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Кудрявцева Н. Н., Труфакин В. А. (2004) Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных органов мышей под влиянием хронического социального стресса, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **90**, 1522-1529.
- Тендитник М. В., Шурлыгина А. И., Мельникова Е. В., Пантелеева Н. Г., Смагин Д. А., и др. (2010) Эффекты диазепам на субпопуляционный состав лимфоцитов иммунокомпетентных органов тревожных самцов мышей, *Бюлл. СО РАМН*, **30**, 46-50.
- Gryazeva, N. I. Shurlygina, A. V. Verbitskaya, L. V. Mel'nikova, E. V. Kudryavtseva, N. N., et al. (2001) Changes in various measures of immune status in mice subject to chronic social conflict, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **31**, 1, 75-81, doi: 10.1023/a:1026634532698.
- Kudryavtseva, N. N., Shurlygina, A. V., Galyamina, A. G., Smagin, D. A., Popova, N. A., et al. (2019). Immunopathology of mixed anxiety/depression disorder: An experimental approach to studies of immunodeficiency state (review), *Neurosci. Behav. Physiol.*, **49**, 384-398, doi: 10.1007/s11055-019-00745-9.
- Кудрявцева Н. Н., Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Тендитник М. В., Бондарь Н.П., и др. (2011) Нарушение клеточного цикла в тимусе и селезенке у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: эффекты диазепам, *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.*, **151**, 391-394, doi: 10.1007/s10517-011-1343-7.
- Каледин В. И., Кудрявцева Н. Н. (1992) Социальный конфликт и рост опухоли, *Доклад. Ак. Наук*, **234**, 1117-1120.
- Каледин В. И., Тендитник М. В., Николин В. П., Попова Н. А., Кудрявцева Н. Н. (2006) Влияние психоэмоционального состояния на рост и метастазирование опухоли Льюис у мышей, *Докл. Биол. Наук*, **406**, 57-59.
- Kudryavtseva, N. N., Tenditnik, M. V., Nikolin, V. P., Popova, N. A., and Kaledin, V. I. (2007) The influence of psychoemotional status on metastasis of Lewis lung carcinoma and hepatocarcinoma-29 in mice of C57BL/6J and CBA/Lac strains, *Exp. Oncol.*, **29**, 35-38.
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., and Prevarskaya, N. (2013) Targeting apoptosis by the remodeling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis, *FEBS J.*, **280**, 5500-5510, doi: 10.1111/febs.12246.
- Kędzierska, H., and Piekiełko-Witkowska, A. (2017) Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer, *Cancer Lett.*, **396**, 53-65, doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.013.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Gross, A. L., Gallo, J. J., and Eaton, W. W. (2010) Depression and cancer risk: 24 years of follow-up of the Baltimore Epidemiologic Catchment Area sample, *Cancer Causes Control*, **21**, 191-199, doi: 10.1007/s10552-009-9449-1.
- Jia, Y., Li, F., Liu, Y. F., Zhao, J. P., Leng, M. M., et al. (2017) Depression and cancer risk: a systematic review and meta-analysis, *Public Health*, **149**, 138-148, doi: 10.1016/j.puhe.2017.04.026.
- McEwen, B. S. (2016) Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons, *Brain Res.*, **1645**, 50-54, doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.043.
- Patel, D., Anilkumar, S., Chattarji, S., and Buwalda, B. (2018) Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus, *Behav. Brain Res.*, **347**, 314-324, doi: 10.1016/j.bbr.2018.03.034.
- Коваленко И. Л., Смагин Д. А., Галямина А. Г., Орлов Ю. Л., Кудрявцева Н. Н. (2016) Изменение экспрессии дофаминергических генов в структурах мозга самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: данные RNA-seq, *Мол. Биол.*, **50**, 184-187, doi: 10.18699/VJ20.42-о.
- Babenko, V. N., Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., Galyamina, A. G., and Kudryavtseva, N. N. (2020). Differentially expressed genes of the *Slc6a* family as markers of altered brain neurotransmitter system function in pathological states in mice, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **50**, 199-209, doi: 10.1007/s11055-019-00888-9.
- Kudryavtseva, N. N., Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., Galyamina, A. G., Vishnivetskaya, G. B., et al. (2017) Serotonergic genes in the development of anxiety/depression-like state and pathology of aggressive behavior in male mice: RNA-seq data, *Mol. Biol.*, **51**, 251-262, doi: 10.7868/S0026898417020136.

25. Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., Galyamina, A. G., Bragin, A. O., Orlov, Y. L., et al. (2016) Dysfunction in ribosomal gene expression in the hypothalamus and hippocampus following chronic social defeat stress in male mice as revealed by RNA-Seq, *Neural Plast.*, **2016**, 3289187, doi: 10.1155/2016/3289187.
26. Smagin, D. A., Galyamina, A. G., Kovalenko, I. L., Babenko, V. N., and Kudryavtseva, N. N. (2019) Aberrant expression of collagen gene family in the brain regions of male mice with behavioral psychopathologies induced by chronic agonistic interactions, *Biomed. Res. Int.*, **2019**, 7276389, doi: 10.1155/2019/7276389.
27. Redina, O., Babenko, V., Smagin, D., Kovalenko, I., Galyamina, A., et al. (2020) Gene expression changes in the ventral tegmental area of male mice with alternative social behavior experience in chronic agonistic interactions, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6599, doi: 10.3390/ijms21186599.
28. Redina, O. E., Babenko, V. N., Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., Galyamina, A. G., et al. (2021) Correlation of expression changes between genes controlling 5-HT synthesis and genes *Crh* and *Trh* in the midbrain raphe nuclei of chronically aggressive and defeated male mice, *Genes (Basel)*, **12**, 1811, doi: 10.3390/genes12111811.
29. Troubat, R., Barone, P., Leman, S., Desmidt, T., Cressant, A., et al. (2021) Neuroinflammation and depression: A review, *Eur. J. Neurosci.*, **53**, 151-171, doi: 10.1111/ejn.14720.
30. Juruena, M. F., Bocharova, M., Agustini, B., and Young, A. H. (2018) Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review, *J. Affect. Disord.*, **233**, 45-67, doi: 10.1016/j.jad.2017.09.052.
31. Carrera-Gonzalez, M. P., Ramirez-Exposito, M. J., de Saavedra, J. M., Sanchez-Agosta, R., Mayas, M. D., et al. (2011) Hypothalamus-pituitary-thyroid axis disruption in rats with breast cancer is related to an altered endogenous oxytocin/insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) system, *Tumour Biol.*, **32**, 543-549, doi: 10.1007/s13277-010-0149-y.
32. Zuloaga, D. G., Carbone, D. L., Quihuis, A., Hiroi, R., Chong, D. L., et al. (2012) Perinatal dexamethasone-induced alterations in apoptosis within the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus are influenced by age and sex, *Neurosci. Res.*, **90**, 1403-1412, doi: 10.1002/jnr.23026.
33. Buttenschon, H. N., Krogh, J., Nielsen, M. N., Kaerlev, L., Nordentoft, M., et al. (2017) Association analyses of depression and genes in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *Acta Neuropsychiatr.*, **29**, 59-64, doi: 10.1017/neu.2016.26.
34. Kudryavtseva, N. N. (1991) A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice, *Aggress. Behav.*, **17**, 285-291, doi: 10.1002/1098-2337(1991)17:5<285::AID-AB2480170505>3.0.CO;2-P.
35. Kudryavtseva, N. N. (2000) Agonistic behavior: A model, experimental studies, and perspectives, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **30**, 293-305, doi: 10.1007/BF02471782.
36. Kudryavtseva, N. N., Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., and Vishnivetskaya, G. B. (2014) Repeated positive fighting experience in male inbred mice, *Nat. Protoc.*, **9**, 2705-2717, doi: 10.1038/nprot.2014.156.
37. Boyadjieva, N. I., and Sarkar, D. K. (2013) Microglia play a role in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in developing hypothalamic neurons, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **37**, 252-262, doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01889.x.
38. Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., et al. (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons, *PLoS One*, **4**, e5045, doi: 10.1371/journal.pone.0005045.
39. Babenko, V. N., Smagin, D. A., Galyamina, A. G., Kovalenko, I. L., and Kudryavtseva, N. N. (2018) Altered *Slc25* family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder, *BMC Neurosci.*, **19**, 79, doi: 10.1186/s12868-018-0480-6.
40. Fritsch, M., Günther, S. D., Schwarzer, R., Albert, M. C., Schorn, F., et al. (2019) Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis, *Nature*, **575**, 683-687, doi: 10.1038/s41586-019-1770-6.
41. Muthu, M., Cheriyan, V. T., and Rishi, A. K. (2015) CARP-1/CCAR1: a biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis, *Oncotarget*, **6**, 6499-6510, doi: 10.18632/oncotarget.3376.
42. Wang, Q., Ye, S., Chen, X., Xu, P., Li, K., et al. (2019) Mitochondrial NOS1 suppresses apoptosis in colon cancer cells through increasing SIRT3 activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **515**, 517-523, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.114.
43. Roberts, A. W., Wei, A. H., and Huang, D. C. S. (2021) BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies, *Blood*, **138**, 1120-1136, doi: 10.1182/blood.2020006785.
44. AACR Project GENIE Consortium (2017) AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium, *Cancer Discov.*, **7**, 818-831, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0151.
45. Osorio, F. G., Soria-Valles, C., Santiago-Fernández, O., Bernal, T., Mittelbrunn, M., et al. (2016) Loss of the proteostasis factor AIRAPL causes myeloid transformation by deregulating IGF-1 signaling, *Nat. Med.*, **22**, 91-96, doi: 10.1038/nm.4013.
46. Zhang, G., and Zhang, G. (2019) Upregulation of FoxP4 in HCC promotes migration and invasion through regulation of EMT, *Oncol. Lett.*, **17**, 3944-3951, doi: 10.3892/ol.2019.10049.
47. Hua, X., Chen, J., and Wu, L. (2019) Identification of candidate biomarkers associated with apoptosis in melanosis coli: GNG5, LPAR3, MAPK8, and PSMC6, *Biosci. Rep.*, **39**, BSR20181369, doi: 10.1042/BSR20181369.
48. Xu, P., Zhang, G., Hou, S., and Sha, L. G. (2018) MAPK8 mediates resistance to temozolomide and apoptosis of glioblastoma cells through MAPK signaling pathway, *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 1419-1427, doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.084.
49. Chen, W., Zheng, G., Huang, J., Zhu, L., Li, W., et al. (2021) CircMED13L\_012 promotes lung adenocarcinoma progression by upregulation of MAPK8

- mediated by miR-433-3p, *Cancer Cell Int.*, **21**, 111, doi: 10.1186/s12935-021-01811-4.
50. Sohn, E. J., Shin, M. J., Eum, W. S., Kim, D. W., Yong, J. I., et al. (2016) Tat-NOL3 protects against hippocampal neuronal cell death induced by oxidative stress through the regulation of apoptotic pathways, *Int. J. Mol. Med.*, **38**, 225-235, doi: 10.3892/ijmm.2016.2596.
  51. Valentino, M., Dejana, E., and Malinverno, M. (2020) The multifaceted *PDCD10/CCM3* gene, *Genes Dis.*, **8**, 798-813, doi: 10.1016/j.gendis.2020.12.008.
  52. Zhang, H., Ma, X., Deng, X., Chen, Y., Mo, X., et al. (2012) PDCD10 interacts with STK25 to accelerate cell apoptosis under oxidative stress, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **17**, 2295-2305, doi: 10.2741/4053.
  53. Dong, C., Fan, B., Ren, Z., Liu, B., and Wang, Y. (2021) CircSMARCA5 facilitates the progression of prostate cancer through miR-432/PDCD10 axis, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **36**, 70-83, doi: 10.1089/cbr.2019.3490.
  54. Urfali-Mamatoglu, C., Kazan, H. H., and Gündüz, U. (2018) Dual function of programmed cell death 10 (PDCD10) in drug resistance, *Biomed. Pharmacother.*, **101**, 129-136, doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.020.
  55. Liu, J., Chen, Z., Cui, Y., Wei, H., Zhu, Z., et al. (2020) Berberine promotes XIAP-mediated cells apoptosis by upregulation of miR-24-3p in acute lymphoblastic leukemia, *Aging (Albany NY)*, **12**, 3298-3311, doi: 10.18632/aging.102813.
  56. Yang, W.Z., Zhou, H., Yan, Y. (2018) XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 125-130, doi: 10.3892/mmr.2017.7925.
  57. Saraei, R., Soleimani, M., Movassaghpour Akbari, A. A., Farshdousti Hagh, M., Hassanzadeh, A., et al. (2018) The role of XIAP in resistance to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in leukemia, *Biomed. Pharmacother.*, **107**, 1010-1019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.065.
  58. Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. K. (2018) Apoptosis: A target for anticancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 448, doi: 10.3390/ijms19020448.
  59. Ильницкая С. И., Николин В. П., Попова Н. А., Августинович Д. Ф., Каледин В. И., и др. (2009) Влияние этанола на процессы метастазирования аденокарциномы Льюис у самцов мышей с разным эмоциональным состоянием, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **95**, 74-78.
  60. Kaledin, V. I., Ilnitskaya, S. I., Nikolin, V. P., Popova, N. A., Smagin, D. A., et al. (2009) Limiting effect of diazepam on Lewis lung carcinoma metastasis in anxious male mice, *Exp. Oncol.*, **31**, 62-64.
  61. Strange, K. S., Kerr, L. R., Andrews, H. N., Eberman, J. T., and Weinberg, J. (2000) Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model, *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 89-102, doi: 10.1016/s0892-0362(99)00049-5.
  62. Wu, X., Liu, B. J., Ji, S., Wu, J. F., Xu, C. Q., et al. (2015) Social defeat stress promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase signaling in a mouse model of lung carcinoma, *Mol. Med. Rep.*, **12**, 1405-1412, doi: 10.3892/mmr.2015.3559.
  63. Spiegel, D., and Sephton, S. E. (2001) Psychoneuro-immune and endocrine pathways in cancer: effects of stress and support, *Semin. Clin. Neuropsychiatry*, **6**, 252-265, doi: 10.1053/scnp.2001.26995.
  64. Vegas, O., Beitia, G., Sánchez-Martin, J. R., Arregi, A., and Azpiroz, A. (2004) Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress, *Behav. Brain Res.*, **155**, 125-134, doi: 10.1016/j.bbr.2004.04.006.
  65. Azpiroz, A., Garmendia, L., Fano, E., and Sanchez-Martin, J. R. (2003) Relations between aggressive behavior, immune activity, and disease susceptibility, *Aggress. Viol. Behav.*, **8**, 433-453.
  66. Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Коваленко И. Л., Галямина А. Г., Грицык О. Б., и др. (2014, а) Изменения иммунного статуса у самцов мышей, вызванные повторным опытом агрессии, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **11**, 1268-1279.
  67. Alperina, E., Idova, G., Zhukova, E., Zhanaeva, S., and Kozhemyakina, R. (2019) Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression, *Neurosci. Lett.*, **692**, 193-198, doi: 10.1016/j.neulet.2018.11.012.
  68. Rowse, G. J., Weinberg, J., Bellward, G. D., and Eberman, J. T. (1992) Endocrine mediation of psychosocial stressor effects on mouse mammary tumor growth, *Cancer Lett.*, **65**, 85-93, doi: 10.1016/0304-3835(92)90217-j.
  69. Giraldi, T., Perissin, L., Zorzet, S., Rapozzi, V., and Rodani, M. G. (1994) Metastasis and neuroendocrine system in stressed mice, *Int. J. Neurosci.*, **74**, 265-278, doi: 10.3109/00207459408987245.
  70. Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C., and Robespierre de Souza, W. (2003) Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth, *Brain Behav. Immun.*, **1**, 43-54, doi: 10.1016/s0889-1591(02)00057-0.
  71. Perissin, L., Rapozzi, V., Zorzet, S., and Giraldi, T. (1996) Blockers of adrenergic neurons and receptors, tumor progression and effects of rotational stress in mice, *Anticancer Res.*, **16**, 3409-3413.
  72. Ben-Eliyahu, S., Shakhbar, G., Page, G. G., Stefanski, V., and Shakhbar, K. (2000) Suppression of NK cell activity and of resistance to metastasis by stress: a role for adrenal catecholamines and beta-adrenoceptors, *Neuroimmunomodulation*, **8**, 154-164, doi: 10.1159/000054276.
  73. Freire-Garabal, M., Rey-Méndez, M., García-Vallejo, L. A., Balboa, J., Suárez, J. M., et al. (2004) Effects of nefazodone on the development of experimentally induced tumors in stressed rodents, *Psychopharmacology (Berl)*, **176**, 233-238, doi: 10.1007/s00213-004-1909-4.
  74. Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell IV, T. L., Masur, K., et al. (2006) The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by  $\beta$ -blockers, *Int. J. Cancer*, **118**, 2744-2749, doi: 10.1002/ijc.21723.
  75. Shurlygina, A. V., Galiamina, A. G., Mel'nikova, E. V., Panteleeva, N. G., Tenditnik, M. V., et al. (2015) Effects of roncoleukin on measures of immunity and the anxious-depressive state induced by chronic social stress in male mice, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **45**, 8, 902-909.

**DYSFUNCTION OF THE GENES ASSOCIATED  
WITH CARCINOGENESIS AND APOPTOSIS,  
DEVELOPING IN THE HYPOTHALAMUS  
UNDER CHRONIC SOCIAL DEFEAT STRESS IN MALE MICE**

**A. G. Galyamina<sup>1#</sup>, D. A. Smagin<sup>1#</sup>, I. L. Kovalenko<sup>1</sup>, O. E. Redina<sup>1</sup>,  
V. N. Babenko<sup>1</sup>, N. N. Kudryavtseva<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> *FRC Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,  
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: natnik@bionet.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 199034 Saint-Petersburg, Russia*

Chronic social stress caused by daily agonistic interactions in male mice leads to the development of a mixed anxiety/depression-like disorder, which is accompanied by the development of psychogenic immunodeficiency and stimulation of oncological processes, accompanied by many neurogenomic changes in brain regions. The aim of the study was to identify differentially expressed genes (DEGs) involved in the mechanisms of carcinogenesis and apoptosis in the hypothalamus of male mice with depression-like symptoms and, for comparison, in aggressive male mice with positive social experience. To obtain animals with a 20-day alternative social experience, a model of chronic social conflict was used. The analysis of mouse hypothalamic transcriptome data (RNA-Seq) revealed similar changes in many DEGs in aggressive and depressed animals in relation to the control state, however, the number of differentially expressed genes was significantly less in aggressive than in depressed males. It can be assumed that a unidirectional genes expression change associated with the oncogenesis and apoptosis processes may be the result of a long-term social stress effect of different severity caused by agonistic interactions. In addition, 26 genes with unchanged expression were found in aggressive animals, which can provoke carcinogenesis or inhibit apoptosis. We suppose that the *Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10* and *Xiap* genes, the expression of which was most correlated with the expression of other DEGs, makes it possible to put forward them as coordinating neurogenomic changes in the hypothalamus. Further study of the role of these genes may be useful for the development of methods for the pharmacological correction of psychosomatic pathologies.

*Keywords:* apoptosis, carcinogenesis, RNA-Seq, DEG, hypothalamus, chronic social stress



УДК 577.15

## АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СТЕРОИДОГЕННОГО РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ОСТРОЙ ФАЗЫ (STARD1) ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 2022 С.В. Замалутдинова<sup>1\*</sup>, Л.В. Исаева<sup>2</sup>, А.В. Замалутдинов<sup>1</sup>, Я.В. Фалетров<sup>3</sup>, М.А. Рубцов<sup>1,4</sup>, Л.А. Новикова<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: podgorodova.sofya@yandex.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия; электронная почта: novik@genebee.msu.ru

<sup>3</sup> Белорусский государственный университет, НИИ физико-химических проблем, 220030 Минск, Беларусь; электронная почта: yaroslav82@tut.by

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва, Россия; электронная почта: ma\_rubtsov@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2022

После доработки 18.08.2022

Принята к публикации 19.08.2022

Одним из главных препятствий для успешного использования в биотехнологических процессах клеток *Escherichia coli*, способных осуществлять трансформацию стероидов, является неэффективный транспорт в клетки стероидных субстратов. В работе тестирована возможность использования белка-переносчика холестерина человека – стероидогенного регуляторного белка острой фазы (STARD1) – для повышения эффективности поглощения стероидов клетками *E. coli*. Получены генетические конструкции для синтеза в клетках *E. coli* BL21(DE3) делетированной версии белка STARD1, включающей функциональный домен (66–285 аминокислотные остатки), или белка STARD1(66–285)-GFP, несущих на *N*-конце последовательность бактериального белка *pelB*, адресующую белок в периплазму. Анализ препаратов клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP с использованием флуориметрии и Вестерн-иммуноблоттинга подтвердил, что использованная система экспрессии обеспечивает синтез полноразмерного гетерологичного белка. С использованием флуоресцентной спектроскопии показано, что присутствие STARD1 обеспечивает увеличение эффективности ассимиляции NBD-меченых аналогов холестерина клетками *E. coli*/pET22b/STARD1 в 1,3–1,6 раза ( $p < 0,05$ ) в сравнении с клетками дикого штамма. Таким образом, впервые обнаружено, что STARD1 человека способен проявлять функциональную активность в клетках бактерий, что открывает перспективы для оптимизации и использования фундаментально нового подхода для повышения эффективности поглощения стероидов клетками – включения в мембрану клетки специфического белка-переносчика, который может расширить арсенал методов, используемых при получении штаммов микроорганизмов для синтеза широко востребованных стероидных соединений.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стероидогенный регуляторный белок острой фазы, *Escherichia coli*, холестерол, биотрансформация стероидов, флуоресценция.

**DOI:** 10.31857/S0320972522090111, **EDN:** BVHEIB

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё шире используются технологии, основанные на биокатализе.

Большой интерес, в частности, представляют штаммы микроорганизмов, с использованием которых можно обеспечить более дешёвое и экологически безопасное по сравнению с

Принятые сокращения: МЦД – метилированный β-циклодекстрин; 20NP – 20-((NBD)амино)-прегн-5-ен-3β-ол; GFP – зелёный флуоресцентный белок; NBD – 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил; *pelB* – *N*-концевая сигнальная последовательность пектацгилазы В *Erwinia carotovora*; STARD1 – стероидогенный регуляторный белок острой фазы (StAR, steroidogenic acute regulatory protein).

\* Адресат для корреспонденции.

химическими способами производство стероидных соединений, в том числе и различных лекарственных препаратов, которые пользуются очень высоким спросом на фармацевтическом рынке [1]. В литературе представлено множество сообщений о получении и использовании штаммов микроорганизмов, содержащих функционально активные стероид-трансформирующие ферменты, способные осуществлять стерео- и региоспецифичные реакции (см, например, [2–5]), однако такие микроорганизмы часто демонстрируют низкую каталитическую активность. Основным ограничивающим фактором является плохая растворимость экзогенных стероидных субстратов в водной среде, что лимитирует их поглощение клеткой из среды культивирования [5, 6]. Подходы, используемые для увеличения растворимости стероидов и снятия данного ограничения, включают как внесение в среды органических добавок (например, органических растворителей или детергентов, которые часто нарушают целостность и жизнеспособность клеток и таким образом снижают их биокаталитическую активность) [7], так и использование жидких двухфазных систем [8] (что может приводить к усложнению технологических процессов).

В клетках коры надпочечников и половых желез млекопитающих транспорт холестерина к внутренней мембране митохондрий, лимитирующий процесс синтеза стероидных гормонов, осуществляется с участием белка StAR (*steroidogenic acute regulatory protein* – стероидогенный регуляторный белок острой фазы), называемого также STARD1 [9]. Данный белок, имеющий липид-связывающий домен START, доставляет холестерол от наружной к внутренней митохондриальной мембране, где локализован цитохром P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), катализирующий начальные реакции каскада конверсии холестерина в стероидные гормоны [10, 11]. В нескольких работах, проводимых с целью выделения STARD1 и изучения его каталитических и структурных характеристик *in vitro*, продемонстрирована возможность синтеза STARD1 в клетках *E. coli* и правильного последующего фолдинга (например, [12, 13]). Однако к настоящему времени не проводилось исследований, направленных на изучение функционирования STARD1 в живых микроорганизмах.

Целью данной работы являлось тестирование активности STARD1 человека в клетках *E. coli* и возможности использования данного белка-переносчика холестерина для повышения эффективности транспорта стероидных соединений в клетку бактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использованы: метилированный β-циклодекстрин (МЦД) («Wacker Chemie», Германия), нитроцеллюлозные фильтры Hybond-C Extra («Amersham Biosciences», Великобритания), конъюгат первичных антител козы против зелёного флуоресцентного белка (GFP) с пероксидазой хрена («Rockland», США), 22-NBD-холестерол («Thermo Fisher Scientific», США), наборы реактивов для работы с ДНК – ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit и ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit («Zymo Research», США), и Western blotting detection kit Western Bright™ ECL («Advanta», США), эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразы и ДНК-модифицирующие ферменты («MBI Fermentas», Литва). Олигонуклеотиды синтезированы в компании «Евроген» (Россия). Аналог холестерина 20-((NBD)амино)-прегн-5-ен-3β-ол (20NP) синтезирован ранее как описано Фалетровым и соавторами [14].

**Использованные штаммы *E. coli* и плазмиды.** В работе использованы клетки *E. coli*, штамм Top10 («Евроген») и штамм BL21(DE3) («Gibco BRL», США). Вектор pET-22b(+), содержащий промотор бактериофага T7 и *pelB*, кодирующую N-концевую адресующую в периплазму последовательность пектатлиазы В *Erwinia carotovora*, поставлен фирмой «Novagen» (США). Плазмида Н-МБР-3С-STARD1<sub>66–285</sub> [13], содержащая кДНК, кодирующую STARD1(66–285), любезно предоставлена Н.Н. Случанко (Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва); плазмида pCoxIV-P450<sub>scc</sub>-2A-GFP [15], содержащая кДНК, кодирующую GFP, сконструирована ранее.

**Конструирование плазмид.** Молекулярное клонирование осуществляли с использованием *E. coli* Top10 согласно стандартным протоколам [16]. **pET-22b/STARD1.** Фрагмент ДНК -*Bam*HI-STARD1(66–285)-*Hind*III- вырезали из Н-МБР-3С-STARD1<sub>66–285</sub> и лигировали с вектором pET-22b(+), расщеплённым по тем же сайтам. Промежуточный вектор обрабатывали *Bam*HI и фрагментом Кленова (для удаления двух пар оснований) и лигировали по тупым концам. Целевая плазмида pET-22b/STARD1 содержала в рамке считывания кДНК для STARD1(66–285) с N-концевой сигнальной последовательностью *pelB* (22 а.о.). **pET-22b/STARD1–GFP.** Последовательности кДНК, кодирующие STARD1 и GFP, получены с помощью ПЦР-амплификации: STARD1 – с использованием pET22b/STARD1 в качестве матрицы и прямого (содержащего

сайт рестрикции *Bam*HI) и обратного (содержащего сайт рестрикции *Xba*I и точечные нуклеотидные замены для удаления стоп-кодона) праймеров; *GFP* – с использованием pCNA3.1/pCoxIV-P450<sub>scs</sub>-2A-GFP и прямого и обратного праймеров с сайтами рестрикции *Xba*I и *Not*I соответственно. ПЦП-Продукты обрабатывали *Bam*HI/*Xba*I (ген *STARD1*) или *Xba*I/*Not*I (ген *GFP*) и встраивали в вектор pET-22b(+), рестрицированный *Bam*HI/*Not*I. Получена плаزمид, включающая последовательности, кодирующие *STARD1* с *N*-концевым сигнальным пептидом *pelB* и белок *GFP*, слитые в одну рамку считывания. Структуры плазмид подтверждали секвенированием.

#### Экспрессия кДНК рекомбинантных белков.

Гетерологичные гены экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3), культивируемых в «среде для аутоиндукции» (среда LB с добавлением солей и сахаров) [17] в присутствии ампициллина (100 мкг/мл). Синтез рекомбинантных белков индуцировали добавлением 0,2%-ной  $\alpha$ -лактозы и осуществляли в течение 3–48 ч при 26 °C–28 °C.

**Ds-Na-ПААГ-электрофорез и Вестерн-блот-анализ.** Клетки из 1,5 мл культуры осаждали центрифугированием (12 000 g, 5 мин, «Eppendorf Minispin», Германия), осадки ресуспендировали в 100 мкл буфера для приготовления образцов для электрофореза (Sample Buffer) [18] и денатурировали белки кипячением (100 °C, 2 мин). Лизаты клеток анализировали, используя Ds-Na-ПААГ-электрофорез [18] и Вестерн-блоттинг [19]. При проведении иммуноблоттинга мембраны последовательно обрабатывали конъюгатом первичных антител козы против *GFP* с пероксидазой хрена в разведении 1 : 10000 (v/v) и хемилюминесцентным (ECL) субстратом в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [20].

**Анализ клеток на наличие GFP.** Клетки, трансформированные pET-22b/*STARD1*-*GFP*, выращенные в течение 17 или 25 ч в присутствии лактозы [17], осаждали из 2 мл культуры (12 000 g, 5 мин, «Eppendorf Minispin») и ресуспендировали в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 150 mM NaCl. Указанный буфер использовали для разведения и получения проб с величиной поглощения  $A_{600}$ , соответствующей 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 или 3,0. Испускание *GFP* в пробах (объем 2 мл) измерялось с помощью флуориметра FluoroMax-3 («HORIBA Jobin Yvon GmbH», Германия). Условия регистрации спектра флуоресценции: поглощение 395 нм/испускание 507 нм, щель 5 нм.

**Анализ функциональной активности *STARD1* в клетках *E. coli*.** Культуры нетрансформированных клеток и клеток, экспрессирующих кДНК *STARD1*, выращенные в течение ночи в присутствии лактозы [17], разбавляли свежей средой до  $A_{600} = 1,0$  и далее культивировали в условиях индукции синтеза рекомбинантных белков в присутствии МЦД (0,01 mM), ампициллина (100 мкг/мл) и стероида 22-NBD-холестерола (10 мкМ) или 20NP (4 мкМ), периодически отбирая аликвоты контрольных и опытных суспензий, содержащие одинаковое количество клеток. Клетки осаждали (12 000 g, 2 мин, «Eppendorf Minispin»), трижды промывали раствором МЦД (0,05 mM) и разрушали, обрабатывая суспензию клеток в 96%-ном EtOH ультразвуком (15 сек и 20 сек, интервал 10 сек). Полученные после центрифугирования (12 000 g, 2 мин) супернатанты и осадки, суспендированные в 0,5 мл 96%-ного EtOH, использовали для анализа. Объем проб – 2 мл, состав проб: 0,4 мл опытного образца (фон – 0,4 мл 96%-ного EtOH) и 1,6 мл 72%-ного EtOH. Уровень содержания NBD-меченых стеролов в пробах оценивали с использованием флуориметра (FluoroMax-3, «HORIBA Jobin Yvon GmbH»); условия регистрации спектра флуоресценции: поглощение 470 нм/испускание 535 нм, щель 5 нм. Для статистической обработки полученных данных использовали язык программирования R 4.2.1. [21]. При сравнении групп использовали двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белок *STARD1*, осуществляющий в стероидогенных клетках млекопитающих перенос молекул холестерина от наружной к внутренней мембране митохондрий, обнаружен как на наружной мембране, так и в межмембранном пространстве [22]. Для получения аналогичной модели на основе клеток бактерий для изучения функциональных характеристик *STARD1* мы планировали осуществить синтез *STARD1*, который будет направляться в периплазму клеток.

В работе использована кДНК, кодирующая *STARD1*(66–285 а.о.), включающий только функциональный *START*-домен, так как известно, что такая версия белка проявляет ту же функциональную активность, что и полноразмерный *STARD1* – укороченный с *N*-конца *STARD1* теряет способность импортироваться в митохондрии, но остается полностью активным [11]. Далее в тексте для удобства *STARD1*(66–285) обозначен как *STARD1*.

**Анализ экспрессии кДНК слитого белка STARD1-GFP в рекомбинантных клетках.** Первой задачей исследования являлась оценка возможности синтеза в клетках *E. coli* белка человека STARD1, несущего адресующий сигнал для периплазматической локализации. Рекомбинантный штамм получен с использованием плазмиды pET22b/STARD1-GFP, включающей кДНК, кодирующую слитый белок, составленный из STARD1 с N-концевым сигнальным пептидом пектатлиазы В (pelB) и слитого с его C-концом репортерного флуоресцентного белка GFP. Присоединение GFP предпринято для облегчения анализа синтеза гетерологичного белка в клетках *E. coli*.

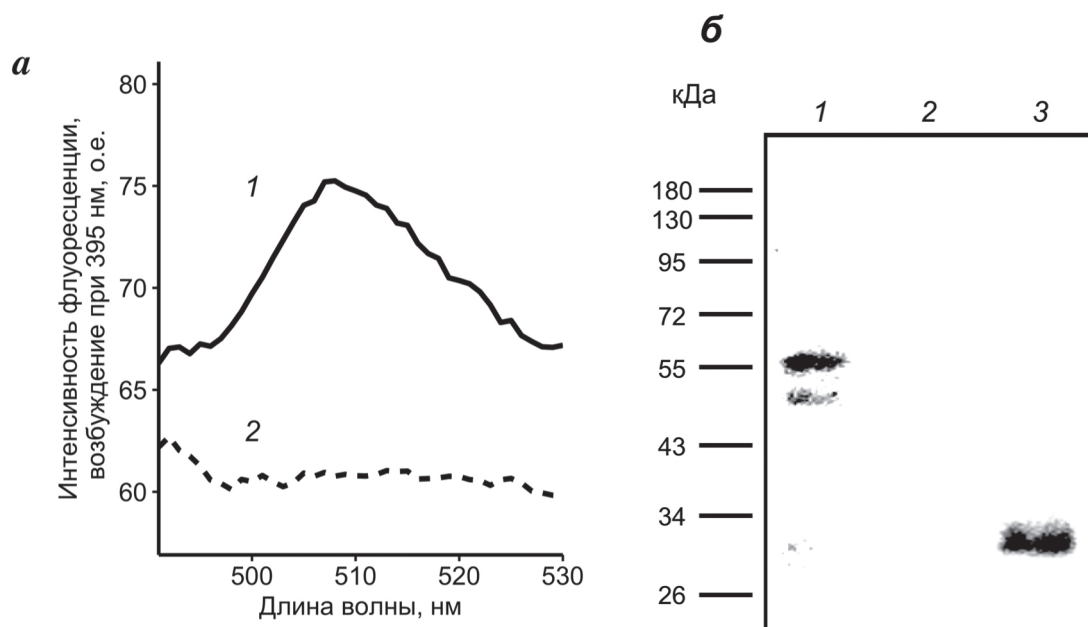
Для проведения анализа использованы суспензии клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP и контрольных нетрансформированных клеток, выращенных в условиях индукции экспрессии гетерологичных генов в течение 17 или 25 ч (см. раздел «Материалы и методы») с  $A_{600}$  от 0,125 до 3,0. Для идентификации STARD1-GFP в пробах осуществлялась регистрация спектра флуоресценции GFP. Во всех пробах, содержащих рекомбинантные клетки, в отличие от контрольных, детектирован флуоресцентный белок. На рис. 1, а приведены спектры, полученные при анализе суспензий рекомбинантных и контрольных клеток, выращенных в течение 17 ч, с  $A_{600} = 3,0$ . Зарегистрированный максимум

испускания флуоресценции (507 нм) соответствует максимуму испускания флуоресценции индивидуального GFP, что свидетельствует о присутствии в клетках полноразмерного STARD1-GFP и о правильной конформации хромофора GFP в составе слитого белка.

Анализ лизатов клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP, культивированных в условиях индукции синтеза гетерологичных белков методом Вестерн-иммуоблоттинга с использованием антисыворотки против GFP, подтвердил, что в них присутствует слитый белок с ожидаемой молекулярной массой ~57 кДа (рис. 1, б, дорожка 1). STARD1-GFP в клетках бактерий, вероятно, частично подвергается деградации — в лизате клеток детектируется некоторое количество меньшего по размеру иммуноспецифичного белка (рис. 1, б, дорожка 1).

Таким образом, мы показали, что генетическая конструкция pET22b/STARD1-GFP обеспечивает синтез полноразмерного гетерологичного белка в клетках *E. coli*.

**Анализ функциональной активности STARD1 в клетках *E. coli*.** Для проведения экспериментов с целью оценки влияния STARD1 человека на эффективность поглощения стероидных соединений клетками *E. coli* получена плаزمида pET22b/STARD1, способная направлять синтез в клетках бактерий индивидуального белка STARD1(66–285) с N-концевой адресующей



**Рис. 1.** Идентификация STARD1-GFP в клетках *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP. а — Анализ суспензий клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP (1) и клеток контрольного штамма (2) с использованием флуориметрии; время индукции 17 ч,  $A_{600} = 3,0$ . Максимум испускания флуоресценции — 507 нм. б — Анализ лизатов клеток методом Вестерн-блоттинга: Ds-Na-ПААГ-электрофорез в 10%-ном геле с последующей иммунодетекцией белков с использованием антител к GFP. 1 — Лизат клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP (50 мкг), 2 — лизат контрольных нетрансформированных клеток (50 мкг), 3 — белок-стандарт GFP (20 мкг). Слева показано положение белков-маркеров молекулярной массы



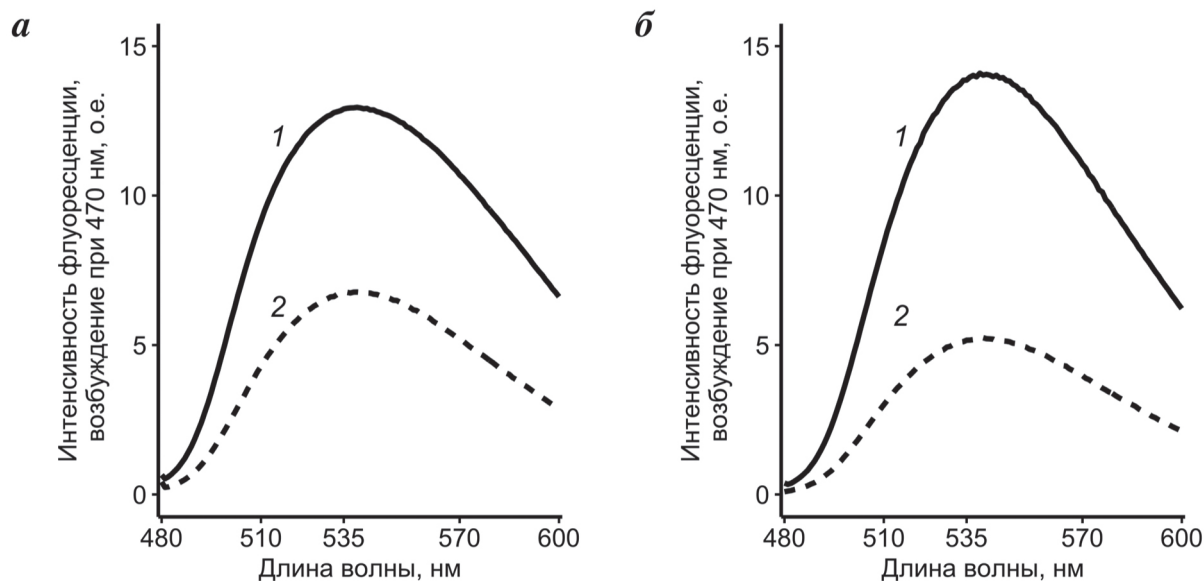
последовательностью *relB*, но без репортерного белка на С-конце, так как присутствие GFP могло препятствовать его функционированию. Для оценки способности STARD1 переносить стеролы в клетки проведён сравнительный анализ эффективности включения флуоресцирующих аналогов холестерина, 22-NBD-холестерола и 20NP, в клетки контрольного штамма и штамма клеток *E. coli*/pET22b/STARD1. Ранее нами было показано, что 22-NBD-холестерол и 20NP способны проникать в клетки *E. coli* [23]. Кроме того, в нескольких работах при проведении экспериментов в системе *in vitro* была продемонстрирована способность изолированного белка STARD1 связывать данные стероидные соединения (например, [24]).

Клетки культивировали в условиях индукции синтеза STARD1 в присутствии 22-NBD-холестерола или 20NP в течение 48 ч, периодически отбирая аликвоты контрольных и опытных суспензий, содержащие одинаковое количество клеток. Для удаления стеролов с поверхности клеток их несколько раз промывали раствором МЦД. Клетки суспендировали в EtOH и разрушали с использованием ультразвука; пробы центрифугировали и в полученных осадках и супернатантах определяли уровень содержания флуоресцирующих стеролов с использованием флуоресцентной спектроскопии (см. раздел «Материалы и методы»). Можно сразу отметить, что флуоресцентные субстраты полностью экстрагируются EtOH и присутствуют только в пробах-супернатантах, которые далее обозначе-

ны как «препараты клеток», в полученных осадках флуоресценция не регистрируется (данные не приведены).

Обнаружено, что во всех временных точках (4, 7, 24 или 48 ч инкубации) содержание флуоресцентных соединений в рекомбинантных клетках превышает их содержание в клетках контрольного штамма.

На рис. 2 представлены результаты одного из проведённых экспериментов: спектры флуоресценции 22-NBD-холестерола и стерола 20NP, регистрируемые в препаратах клеток, несущих ген белка STARD1, в сравнении со спектрами препаратов контрольных клеток, иллюстрирующие разницу в эффективности накопления стероидов в клетках в течение 7 ч. В случае 22-NBD-холестерола экспрессия гена *STARD1* приводит к превышению его содержания в клетке примерно в ~1,8 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 2, а), в случае 20NP содержание стероида выше в ~2,5 раза (рис. 2, б). Согласно результатам статистической обработки полученных данных (результатов 12 измерений для каждого флуоресцентного субстрата при проведении 3 независимых экспериментов), присутствие STARD1 в клетках увеличивает эффективность транспорта аналогов холестерина в  $1,31 \pm 0,16$  раза для 22-NBD-холестерола и в  $1,58 \pm 0,32$  раза для 20NP (Mean  $\pm$  SD;  $p < 0,05$ ). Регистрируемая разница в эффективности ассимиляции 22-NBD-холестерола и 20NP клетками (рис. 2), возможно, является следствием различия фи-



**Рис. 2.** Влияние рекомбинантного STARD1 на эффективность включения NBD-меченых стеролов в клетки бактерий. Анализ препаратов клеток, культивированных в течение 7 ч в условиях индукции синтеза рекомбинантного белка в присутствии (а) 22-NBD-холестерола или (б) 20NP. а, б: 1 – препарат клеток *E. coli*/pET22b/STARD1, 2 – препарат клеток контрольного штамма *E. coli*. Максимум испускания флуоресценции – 530 нм

зико-химических свойств данных стероидов, обладающих разной структурой, либо связана с разным положением NBD-группы в составе стероида, что, как ранее сообщалось, влияет на взаимодействие NBD-меченых аналогов холестерина с белком STARD1 [24].

Из представленных данных следует, что STARD1 человека способен проявлять функциональную активность в клетках бактерий – связывать аналоги холестерина и осуществлять их транспорт через мембрану клеток и таким образом влиять на внутриклеточное содержание стероидных соединений. Присутствие STARD1 в клетках в функционально-активном состоянии указывает на его корректный фолдинг в клетках *E. coli*. STARD1 является чрезвычайно важным регуляторным белком и вовлечён в развитие ряда серьёзных заболеваний, однако к настоящему времени нет однозначных данных о механизме его функционирования [22]. С учётом данных о том, что STARD1 способен осуществлять транспорт холестерина не только в стероидогенных клетках млекопитающих, но и в нестероидогенных клетках, таких как клетки почек обезьяны COS-1 [25] и клетки карциномы печени человека HepG2 [26], King et al. [26] высказали предположение, что механизм, посредством которого функционирует STARD1, может быть реализован в разных типах клеток. Наши результаты свидетельствуют в пользу этого предположения и указывают на то, что STARD1 может функционировать не только в разных типах клеток млекопитающих, но и, возможно, в клетках разных микроорганизмов. Возможность присутствия в клетках *E. coli* активного STARD1 человека открывает перспективы для проведения исследований его характеристик не только с использованием выделенного белка или культур клеток млекопитающих, но и в простых модельных системах *in vivo* на основе клеток *E. coli*.

В данном исследовании впервые обнаружено, что рекомбинантные клетки *E. coli*, осуществляющие синтез белка-переносчика холестерина STARD1, демонстрируют способность более эффективно ассимилировать аналоги холестерина в сравнении с клетками дикого штамма. Полученные результаты указывают на то, что предложенный подход – включение в мембрану специфического белка-переносчика для повышения эффективности транспорта в клетки стероидов или других гидрофобных субстратов – является перспективным и может быть использован, в частности, для оптимизации функционирования микроорганизмов-биокаATALизаторов. Результаты работы представляют собой основу для дальнейших исследований, направленных на понимание механизма функционирования STARD1 в живых клетках *E. coli*, а также на развитие указанного подхода и поиск других белков-переносчиков стероидов, пригодных для повышения эффективности биотрансформации стероидов клетками *E. coli*.

**Вклад авторов.** Л.А. Новикова, М.А. Рубцов – концепция и руководство работой, написание текста; С.В. Замалутдинова, Л.В. Исаева, А.В. Замалутдинов, Я.В. Фалетров, Л.А. Новикова – проведение экспериментов; А.В. Замалутдинов – статистическая обработка результатов.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-08-00467-а). Авторы выражают благодарность Случанко Н.Н. за предоставленные плазмиды pET-22b(+) и H-MBP-3C-STARD1<sub>66–285</sub>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhl, H. (2011) Pharmacology of progestogens, *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.*, **8**, 157-176, doi: 10.1007/978-3-319-14385-9\_2.
2. Fu, B., Ren, Q., Ma, J., Chen, Q., Zhang, Q., et al. (2022) Enhancing the production of physiologically active vitamin D3 by engineering the hydroxylase CYP105A1 and the electron transport chain, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 14, doi: 10.1007/s11274-021-03193-1.
3. Novikova, L. A., Faletrov Y. V., Kovaleva I. E., Mauersberger, S., Luzikov, V. N., et al. (2009) From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1482-1504, doi:10.1134/s0006297909130057.
4. Mauersberger, S., Novikova, L. A., and Shkumatov, V. M. (2013) in *Yarrowia Lipolytica. Microbiology Monographs* (Barth, G., ed.) vol. 25. Springer, Berlin, Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-38583-4\_7.
5. Donova, M. V., and Egorova, O. V. (2012) Microbial steroid transformations: Current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 1423-1447, doi: 10.1007/s00253-012-4078-0.
6. Efimova, V. S., Isaeva, L. V., Rubtsov, M. A., and Novikova, L. A. (2019) Analysis of *in vivo* activity

- of the bovine cholesterol hydroxylase/lyase system proteins expressed in *Escherichia coli*, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 261-273, doi: 10.1007/s12033-019-00158-6.
7. Thevenieau, F., Beopoulos, F., Desfougeres, T., Sabirova, J., Albertin, K., et al. (2010) in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Timmis, K., ed.) 2nd Edn Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1514-1527.
  8. Liu, W.-H., Horng, W.-C., and Tsai, M.-S. (1996) Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 184-189, doi: 10.1016/0141-0229(95)00091-7.
  9. Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., and Stocco, D. M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Biol. Chem.*, **269**, 28314-28322.
  10. Kallen, C. B., Billheimer, J. T., Summers, S. A., Stayrook, S. E., Lewis, M., et al. (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein, *J. Biol. Chem.*, **273**, 26285-26288, doi: 10.1074/jbc.273.41.26285.
  11. Arakane, F., Sugawara, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J. A., et al. (1996) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13731-13736, doi: 10.1073/pnas.93.24.13731.
  12. Arakane, F., Kallen, C. B., Watari, H., Foster, J. A., Sepuri, N. B. V., et al. (1998) The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16339-16345, doi: 10.1074/jbc.273.26.16339.
  13. Sluchanko, N. N., Tugaeva, K. V., Faletrov, Y. V., and Levitsky, D. I. (2016) High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP), *Protein Expr. Purif.*, **119**, 27-35, doi: 10.1016/j.pep.2015.11.002.
  14. Faletrov, Y., Brzostek, A., Plocinska, R., Dziadek, J., Rudaya, E., et al. (2017) Uptake and metabolism of fluorescent steroids by mycobacterial cells, *Steroids*, **117**, 29-37, doi: 10.1016/j.steroids.2016.10.001.
  15. Efimova, V. S., Isaeva, L. V., Labudina, A. A., Tashlitsky, V. N., Rubtsov, M. A., et al. (2019) Polycistronic expression of the mitochondrial steroidogenic P450scc system in the HEK293T cell line, *J. Cell. Biochem.*, **120**, 3124-3136, doi: 10.1002/jcb.27577.
  16. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
  17. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207-34, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
  18. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
  19. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
  20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-270.
  21. R. Core Team (2021) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
  22. Tugaeva, K. V., and Sluchanko, N. N. (2019) Steroidogenic acute regulatory protein: structure, functioning, and regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 233-253, doi: 10.1134/S0006297919140141.
  23. Efimova, V., Faletrov, Y., Isaeva, L., Novikova, L., Rubtsov, M., et al. (2015) Interaction of NBD-labelled fluorescent steroids and a fatty acid with *Escherichia coli*, *FEBS J.*, **282**, Suppl. 1, p. 135, doi: 10.1111/febs.13321.
  24. Tugaeva, K. V., Faletrov, Y. V., Allakhverdiev, E. S., Shkumatov, V. M., Maksimov, E. G., et al. (2018) Effect of the NBD-group position on interaction of fluorescently-labeled cholesterol analogues with human steroidogenic acute regulatory protein STARD1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 58-64, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.014.
  25. Sugawara, T., Holt, J. A., Driscoll, D., Strauss, J. F. 3rd, Lin, D., et al. (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4778-4782, doi: 10.1073/pnas.92.11.4778.
  26. King, S. R., Liu, Z., Soh, J., Eimerl, S., Orly, J., et al. (1999) Effects of disruption of the mitochondrial electrochemical gradient on steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 143-154, doi: 10.1016/S0960-0760(98)00152-6.

**ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE HUMAN STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN (STARD1) EXPRESSED IN *Escherichia coli*****S. V. Zamalutdinova<sup>1\*</sup>, L. V. Isaeva<sup>2</sup>, A. V. Zamalutdinov<sup>1</sup>, Y. V. Faletrov<sup>3</sup>, M. A. Rubtsov<sup>1,4</sup>, and L. A. Novikova<sup>2\*</sup>**<sup>1</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: zamalutdinova.sofya@mail.ru<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: novik@genebee.msu.su<sup>3</sup> Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, 220030 Minsk, Belarus. e-mail: yaroslav82@tut.by<sup>4</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: ma\_rubtsov@mail.ru

One of the main obstacles to the successful use in biotechnological processes of *Escherichia coli* cells capable of steroid transformation is the inefficient transport of steroid substrates into cells. We tested the possibility of using a human cholesterol transfer protein, steroidogenic acute regulatory protein (STARD1), to increase the efficiency of steroid uptake by bacterial cells. Genetic constructs were obtained for the synthesis in *E. coli* BL21(DE3) cells of a deleted version of the STARD1 protein, including a functional domain (66-285 amino acid residues), or of the STARD1(66-285)-GFP protein, both bearing periplasmic targeting sequence of the bacterial protein *pelB* at the N terminus. Analysis of *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP cell preparations using fluorimetry and Western immunoblotting confirmed that the expression system used provides the synthesis of a full-length heterologous protein. Using fluorescence spectroscopy, it was shown that the presence of STARD1 provides an increase in the efficiency of assimilation of NBD-labeled cholesterol analogues by *E. coli*/pET22b/STARD1 cells by 1.3-1.6 times ( $p < 0.05$ ) compared with the cells of the wild strain. Thus, for the first time it was found that human STARD1 is able to exhibit functional activity in bacterial cells, which opens up prospects for optimization and use of a fundamentally new approach to increase the efficiency of steroid uptake by cells - the inclusion of a specific carrier protein in the cell membrane, which can expand the arsenal of methods used to create microorganism strains for the synthesis of widely demanded steroid compounds.

**Keywords:** steroidogenic acute regulatory protein, STARD1, *Escherichia coli*, cholesterol, biotransformation of steroids, fluorescence



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

### 1. Общие положения

**1.1.** Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

**1.2.** Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. В журнале печатаются описания новых экспериментальных методик в области биохимии, теоретических достижений, имеющих значение для биохимии, а также обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов без связи с механизмами, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

**1.3.** К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач. Не принимаются статьи с результатами, новизна которых заключается только в том, что изучаемый хорошо известный объект получен из другого источника.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 1–2 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть свои работы по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать работы, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

**1.4.** Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internacional de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

**1.5.** Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> <https://biochemistrymoscow.com>

**1.6.** Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2021 г. составил 2.824, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 3.038. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов медико-биологического профиля.

**1.7.** Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого

доступа (Open Access). Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства:

<http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/>  
или обратившись в редакцию.

## 2. Порядок подачи рукописей

**2.1.** Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции:

[editorial@biochemistrymoscow.com](mailto:editorial@biochemistrymoscow.com)

[ozrina@bio.chem.msu.ru](mailto:ozrina@bio.chem.msu.ru),

а также поданные через Авторский портал издательства:

<https://publish.sciencejournals.ru>.

**2.2.** Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; строки также следует последовательно пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

**2.3.** Одновременно с русским желателен представить аутентичный английский вариант рукописи.

**2.4.** При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

## 3. Требования к оформлению рукописей

**3.1.** Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

**3.2.** Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

*Индекс УДК* (уникальной десятичной классификации) выделяется *курсивом* и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

*Заглавие* должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты. Авторы, внесшие равный вклад в работу, обозначаются знаком решётки (#).

*Резюме* должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

*Ключевых слов* – не более 15.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

*Текст экспериментальной статьи* следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Материалы и методы, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Заключение, 6) Список литературы, 7) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

*Результаты исследования* обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

*Список цитируемой литературы* должен быть максимально кратким (не более 150 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты,

необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

*Список литературы* печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать doi статьи. Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилиевой файл можно найти на сайтах журнала.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

**3.3. Объем экспериментальной статьи**, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков – не более 8; **краткое сообщение** – не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** – не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** – не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «*Дискуссии*» – до 4 страниц.

#### **4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректур)**

Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.

При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.