

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 7, 2022

SMAD-сигнальный путь – объект регуляторных эффектов микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда: <i>in silico</i> анализ сетей взаимодействия генов-мишеней <i>М.В. Писклова, Г.Ж. Осмак, О.О. Фаворова</i>	843
Алиспоривир нормализует митохондриальную функцию в первичной культуре эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии <i>В.С. Старинец, Д.А. Серов, Н.В. Пеньков, Н.В. Белослудцева, М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев</i>	851
Антибиотик пирроломидин является эффективным разобщителем митохондрий <i>А.М. Фирсов, Л.С. Хайлова, Т.И. Рокицкая, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко</i>	865
Неинвазивная диагностика рака почки с помощью ультрачувствительной иммунодетекции раково-сетчаточных антигенов <i>Ю.М. Шляпников, Е.А. Малахова, Н.В. Потолдыкова, Я.А. Светочева, А.З. Винаров, Д.В. Зинченко, Е.Ю. Зерний, А.А. Замятнин мл., Е.А. Шляпкинова</i>	877
Можно ли рассматривать фетуин-А в качестве биомаркера расстройств аутистического спектра и задержки когнитивного развития? <i>N. Kurt, F.V. Ozgeris, I. Ucuз, Z. Bayraktutan, K.K. Yilmaz, E.Y. Demirdogen, A. Cayir</i>	888
Конъюгаты десмикозина с фрагментами антимикробного пептида онкоцина: синтез, антибактериальная активность, взаимодействие с рибосомой <i>З.З. Хайруллина, Г.И. Макаров, А.Г. Терещенков, В.С. Бувев, Д.А. Лукьянов, В.И. Польшаков, В.Н. Ташлицкий, И.А. Остерман, Н.В. Сумбатян</i>	897
Растительный полисахаридный эррей для изучения углеводов-связывающих белков <i>А.В. Никифорова, В.В. Головченко, П.В. Микишина, О.А. Патова, Т.А. Горшкова, Н.В. Бовин, Н.В. Шилова</i>	918
Агонисты в вытянутой конформации стабилизируют активированное состояние бета-адренорецепторов <i>А.В. Ефимов, О.В. Мещерякова, А.Г. Рязанов</i>	933
Доменная модель организации эукариотического генома: от закрепленных на ядерном матриксе петель ДНК к ТАДам (обзор) <i>С.В. Разин, И.В. Жегалова, О.Л. Кантидзе</i>	946
Влияние пероксиредоксина 6 на уровень транскрипционного фактора р53 <i>М.Г. Шарпов, Р.Г. Гончаров, С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова</i>	962
Маркеры активации астроцитов (обзор) <i>Я.В. Горина, А.Б. Салмина, А.И. Ерофеев, Е.И. Герасимов, А.В. Большакова, П.М. Балабан, И.Б. Безпрозванный, О.Л. Власова</i>	975
Опечатки	999
Анонс	1000

CONTENTS

Vol. 87, Issue 7, 2022

Regulation of SMAD Signaling Pathway by miRNAs Associated with Myocardial Fibrosis: <i>In silico</i> Analysis of Target Gene Networks <i>M. Pisklova, G. Osmak, and O. Favorova</i>	843
Alisporivir Normalizes Mitochondrial Function of Primary Mouse Lung Endothelial Cells under Conditions of Hyperglycemia <i>V. S. Starinets, D. A. Serov, N. V. Penkov, N. V. Belosludtseva, M. V. Dubinin, and K. N. Belosludtsev</i>	851
The Antibiotic Pyrrolomycin as an Effective Mitochondrial Uncoupler <i>A. M. Firsov, L. S. Khailova, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, and Y. N. Antonenko</i>	865
Non-Invasive Kidney Cancer Diagnostics Using Ultrasensitive Immunodetection of Cancer-Retina Antigens <i>Yuri M. Shlyapnikov, Ekaterina A. Malakhova, Natalia V. Potoldykova, Yana A. Svetocheva, Andrei Z. Vinarov, Dmitry V. Zinchenko, Evgeni Yu. Zernii, Andrey A. Zamyatnin, Jr., and Elena A. Shlyapnikova</i>	877
Could Fetuin-A Be a Biomarker for Autism Spectrum Disorder and Cognitive Developmental Delay? <i>N. Kurt, F. B. Ozgeris, I. Ucuz, Z. Bayraktutan, K. K. Yilmaz, E. Y. Demirdogen, and A. Cayir</i>	888
Conjugates of Desmycosin with Fragments of Antimicrobial Peptide Oncocin: Synthesis, Antibacterial Activity, Interaction with Ribosome <i>Z. Z. Khairullina, G. I. Makarov, A. G. Tereshchenkov, V. S. Buev, D. A. Lukianov, V. I. Polshakov, V. N. Tashlitsky, I. A. Osterman, and N. V. Sumbatyan</i>	897
Plant Polysaccharide Array for Studying of Carbohydrate-Binding Proteins <i>A. V. Nikiforova, V. V. Golovchenko, P. V. Mikshina, O. A. Patova, T. A. Gorshkova, N. V. Bovin, and N. V. Shilova</i>	918
Agonists in the Extended Conformation Stabilize the Active State of β -Adrenoceptors <i>A. V. Efimov, O. V. Meshcheryakova, and A. G. Ryazanov</i>	933
Domain Model of Eukaryotic Genome Organization: From DNA Loops Fixed on the Nuclear Matrix to TADs (Review) <i>S. V. Razin, I. V. Zhegalova, and O. L. Kantidze</i>	946
Effect of Peroxiredoxin 6 on p53 Transcription Factor Level <i>M. G. Sharapov, R. G. Goncharov, S. B. Parfenyuk, and O. V. Glushkova</i>	962
Astrocyte Activation Markers (Review) <i>Y. V. Gorina, A. B. Salmina, A. I. Erofeev, E. I. Gerasimov, A. V. Bolshakova, P. M. Balaban, I. B. Bezprozvanny, and O. L. Vlasova</i>	975
Errata	999
Announcement	1000

**SMAD-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ –
ОБЪЕКТ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ микроРНК,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ФИБРОЗОМ МИОКАРДА:
in silico АНАЛИЗ СЕТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ**

© 2022 М.В. Писклова^{1,2*}, Г.Ж. Осьмак^{1,2}, О.О. Фаворова^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦ Кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: pisklova_maria@mail.ru

² РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.06.2022

После доработки 07.06.2022

Принята к публикации 07.06.2022

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – наследственная патология сердца, обусловленная мутациями в генах саркомеров, которая сопровождается фиброзом миокарда в сочетании с прогрессирующей сердечной недостаточностью и аритмиями. Исследования последних лет позволяют предполагать, что в развитие ГКМП вовлечены также нарушения в механизмах регуляции экспрессии генов. МикроРНК – короткие некодирующие РНК – относятся к одному из типов таких регуляторов. Как правило, одна молекула микроРНК регулирует на посттранскрипционном уровне множество генов-мишеней, кодирующих различные белки, в связи с чем установление роли той или иной микроРНК в патогенезе заболевания затруднено. В представленной работе мы отобрали в базе данных PubMed 15 микроРНК, экспрессия которых ассоциирована с фиброзом миокарда – одним из ключевых патологических процессов при ГКМП. При помощи разработанного нами ранее алгоритма проведён *in silico* поиск сигнальных путей, регулируемых этими микроРНК. Оказалось, что 10 микроРНК из их числа вовлечены в регуляцию TGF- β /SMAD-сигнального пути. При этом среди генов SMAD-сигнального пути мишенью большинства рассматриваемых микроРНК служит ген *MYC*, который вовлечён в развитие фиброза в некоторых тканях. Вывод о регуляции того же TGF- β /SMAD-сигнального пути набором других микроРНК, ассоциированных с гипертрофией миокарда при ГКМП, был сделан в нашем предшествующем исследовании. Совпадение результатов двух независимых биоинформатических исследований свидетельствует о том, что SMAD-сигнальный путь действительно служит ключевым объектом регуляции патологических процессов при ГКМП. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание патологических процессов, лежащих в основе развития ГКМП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фиброз, микроРНК, гипертрофическая кардиомиопатия, ГКМП, *in silico* анализ, сети взаимодействия генов, TGF- β /SMAD-сигнальный путь.

DOI: 10.31857/S0320972522070016, **EDN:** AUYNOL

ВВЕДЕНИЕ

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одна из самых распространённых форм наследственных кардиомиопатий. Замещение ткани сердца соединительной тканью – фиброз миокарда – ведущий патогенетический механизм в развитии сердечной недостаточности, аритмий или внезапной сердечной

смерти, которые неизбежно возникают при прогрессировании ГКМП [1]. Сложившееся представление о ГКМП как о заболевании, возникающем вследствие мутаций в генах белков саркомеров [2], претерпело за последние годы существенные изменения. Среди пациентов с ГКМП только в 60% случаев обнаруживаются подобные мутации, что позволяет выдвинуть предположение о вовлечённости в патогенез заболевания механизмов регуляции экспрессии генов на различных уровнях, в том числе на уровне регуляторных микроРНК [3, 4].

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (средняя длина 22 нуклео-

Принятые сокращения: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия; ЛСС – самая большая компонента связности (The Largest Connected Component).

* Адресат для корреспонденции.

тида), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [5]. По данным 22-го релиза курируемой базы miRBase, в организме человека обнаружено 2654 зрелых микроРНК [6]. Показано, что при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, и в частности при кардиомиопатиях, уровни отдельных микроРНК могут изменяться и в плазме крови, и в миокарде [3, 7, 8]. При этом каждая микроРНК имеет большое количество генов-мишеней, что затрудняет поиск и интерпретацию функций и роли в патогенезе даже тех микроРНК, для которых уже была показана ассоциация с заболеванием. Ранее мы предложили алгоритм для предсказания регуляторной функции отдельно взятых микроРНК, основанный на *in silico* анализе структуры сети их генов-мишеней [9]; впоследствии он получил обобщение для предсказания функции совокупности нескольких микроРНК [10]. В представляемой работе проведён отбор и последующий *in silico* анализ функций микроРНК, связанных с фиброзом миокарда, как ключевым патогенетическим процессом при ГКМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда. В базе данных PubMed проведён поиск публикаций, содержащих индексируемые в MeSH-базе термины «cardiomyopathies», «miRNA» и «fibrosis», в период с 2008 г. до февраля 2022 г., и составлен перечень обнаруженных микроРНК.

Дальнейший отбор микроРНК из числа упомянутых в этих работах проводили следующим образом. Среди публикаций выбирали те, в которых для микроРНК была показана ассоциация и/или корреляция с фиброзом миокарда и проведены эксперименты с изменением уровня микроРНК (подавление и сверхэкспрессия микроРНК). Если в работе изучали лишь однонаправленное изменение уровня микроРНК, среди таких публикаций мы отбирали те, в которых были проведены дополнительные эксперименты по изучению роли микроРНК, такие как поиск потенциальных мишеней микроРНК, оценка связывания микроРНК с мишенью, изучение влияния взаимодействия микроРНК с мишенью на различные показатели фиброза. Работы, посвящённые изучению циркулирующих микроРНК, были исключены из рассмотрения, так как уровни микроРНК в плазме крови могут не отражать их уровни в тканях. В случае, когда исследование было проведено на клетках мышей или крыс, отби-

рали микроРНК, которые либо идентичны по нуклеотидному составу микроРНК человека, либо выполняют у человека сходные функции.

В некоторых публикациях не было указано, какую зрелую микроРНК брали для исследования. В таких случаях, используя базу miRBase, мы выбирали те зрелые микроРНК, для которых наименование в графе «Previous IDs» совпадало с наименованием в рассматриваемой статье.

Анализ возможной функции микроРНК. Для предсказания функций микроРНК использовали обобщённый алгоритм, подробно описанный в работах Osmaк et al. [9, 10]. Программный код, которым проведён анализ отобранных микроРНК, доступен по ссылке (онлайн-репозиторий, https://github.com/GJOsmaк/miRNET_fibrosis).

Вкратце, сначала мы строим отдельную сеть взаимодействий продуктов генов-мишеней каждой из отобранных микроРНК, которые экспрессируются в ткани сердца. Узлы сети представлены белковыми продуктами этих генов. Любая пара узлов имеет связь, если «минимальная необходимая оценка взаимодействия» по базе данных STRING (база данных белок-белковых взаимодействий, <https://string-db.org/>, по состоянию на 18 декабря 2020 г.) оценивается не менее 0,9 с настройками по умолчанию. Из каждой построенной сети извлекается самая большая компонента связности (The Largest Connected Component, LCC). Для каждого узла в LCC рассчитывается нормализованная степенная центральность и центральность по посредничеству. Далее мы удаляем узлы из каждой LCC один за другим в порядке от наибольшей суммы обеих центральностей к наименьшей. По мере удаления узлов LCC постепенно распадается на отдельные связанные компоненты, а её мощность (количество входящих в неё узлов) падает. В тот момент, когда LCC перестаёт активно распадаться, а мощность LCC выходит на плато, мы останавливаем процесс и рассматриваем все удалённые узлы как ключевые гены, необходимые для связности построенной сети. (Более подробное описание можно найти в статье Osmaк et al. [9].) Далее, используя два набора, «микроРНК» и «сигнальные пути» онлайн-базы данных биологических путей Reactome (далее — сигнальные пути Reactome), связанные через отобранные ключевые гены, получаем инъективную функцию: «ключевые гены микроРНК → сигнальные пути Reactome». Рассматривая наборы «микроРНК» и «сигнальные пути Reactome» в качестве узлов сети, а набор сопоставлений

«ключевые гены микроРНК → сигнальные пути Reactome» в качестве рёбер, мы строим двудольный неориентированный граф, или сеть «микроРНК–сигнальные пути Reactome». Если построенная сеть содержит не менее двух связанных микроРНК (т.е. микроРНК, соединённых друг с другом через последовательность рёбер и других узлов), ищем минимальное количество узлов из набора «сигнальных путей Reactome», связанных с наибольшим количеством микроРНК, используя жадный алгоритм (greedy algorithm), подробное описание которого дано в статье Osmak et al. [10].

Оценку статистической значимости извлекаемых модулей проводили, исходя из биномиального распределения степеней узлов, соответственно, *p*-value задавалось как вероятность того, что выбранный узел-ген (или группа узлов-генов) будет иметь такое или большее число связей с узлами-микроРНК. Поправку на множественные сравнения вводили по Бонферрони, как это описано ранее [10].

Далее для получения конкретных генов-мишеней строили двудольный граф микроРНК и их генов-мишеней, которые относятся к отобранным сигнальным путям. Гены-мишени с наибольшей входящей степенью узла считали главными акцепторами регуляторных эффектов микроРНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате поиска в базе данных PubMed по запросам, приведённым в разделе «Материалы и методы», найдено 58 публикаций. Из составленного перечня обнаруженных в этих публикациях микроРНК, согласно критериям, описанным в разделе «Материалы и методы», было выбрано 15 микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда. Из них для девяти — hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-203-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-325, hsa-miR-891a-3p, hsa-let-7d-5p — описано антифибротическое действие; а для шести — hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-223-3p — профибротическое действие (таблица).

Построение сетей взаимодействия генов-мишеней и извлечение из них ключевых генов оказалось невозможным для всех 15 выбранных микроРНК; из их числа пришлось исключить hsa-miR-325, hsa-miR-145-3p и hsa-miR-891a-3p в связи с недостатком надёжных данных о взаимодействии белковых продуктов их генов-мишеней.

Для поиска сигнальных путей Reactome, связанных с большинством из оставшихся 12 микроРНК через их ключевые гены, мы, как и ранее [10], использовали жадный алгоритм (рис. 1, а).

На первой итерации алгоритма мы определили SMAD-модуль, показанный на рис. 1, б, который содержит участок SMAD-сигнального пути (в сигнальных путях Reactome он обозначен как SMAD2/SMAD3:SMAD4-гетеротример). Он перепредставлен ключевыми генами-мишенями 10 микроРНК, а именно: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-29-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-203a-3p и hsa-let-7d-5p. Для случайного набора из 12 микроРНК вероятность получения такого модуля, содержащего не менее 10 микроРНК, нацеленных на этот путь, составляет $9,41 \times 10^{-5}$ с поправкой на множественные сравнения по

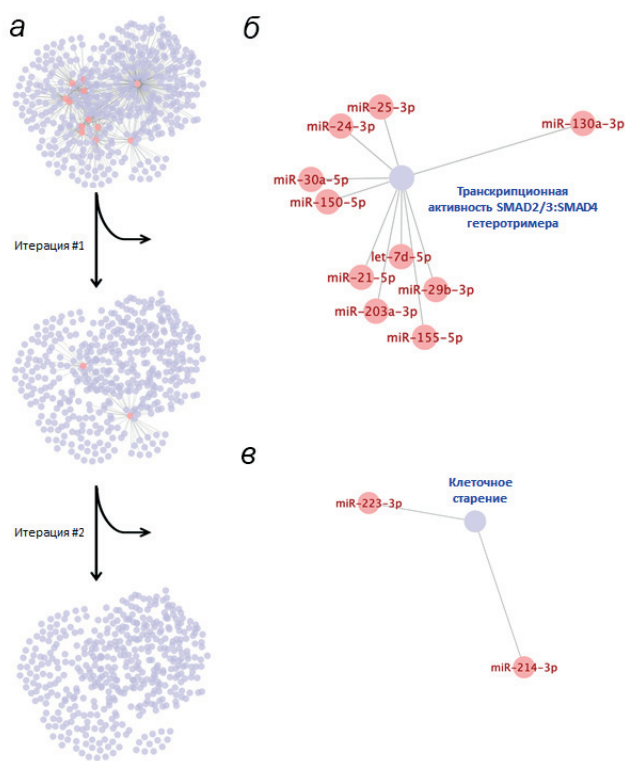


Рис. 1. Предсказание функции отобранных микроРНК при помощи жадного алгоритма. Каждая сеть представляет собой двудольный граф, содержащий два набора узлов: набор микроРНК (отмечены красным) и набор сигнальных путей Reactome. Узлы из набора микроРНК и набора сигнальных путей Reactome соединяются ребром, если ключевые гены-мишени микроРНК перепредставлены в наборе сигнальных путей Reactome. а – Две итерации жадного поиска сигнальных путей Reactome, связанных с выбранными микроРНК в исходной сети. б – Модуль, выявленный после первой итерации жадного алгоритма, который содержит участок SMAD-сигнального пути и связанные с ним 10 микроРНК. в – Модуль, выявленный после второй итерации, содержащий один сигнальный путь «Клеточное старение», связанный с двумя микроРНК.

Выбранные для анализа сетей взаимодействий генов-мишеней микроРНК, которые, по данным литературы, ассоциированы с фибротическим процессом в тканях миокарда, культурах кардиомиоцитов или фибробластов

микроРНК	Объект исследования	Наблюдаемый эффект	Ссылка
Антифибротические микроРНК			
miR-24	миокард мыши; культура фибробластов сердца крысы	снижает уровни экспрессии коллагена I и III типов, α -SMA и фибронектина; улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; подавляет миграцию и пролиферацию фибробластов	[11]
miR-29b	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	подавляет экспрессию коллагена I типа и α -SMA; замедляет фиброз миокарда	[12]
miR-30a-5p	миокард крыс; культура фибробластов сердца крысы	подавляет накопление коллагена и пролиферацию фибробластов	[13]
miR-150-5p	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	ингибирует пролиферацию и миграцию фибробластов, регулирует их дифференцировку в миофибробласты; понижает уровни коллагена I типа и α -SMA; нокаут miR-150-3p резко усугубляет гистологическую картину фиброза	[14]
miR-203-3p	миокард мыши; культура кардиомиоцитов мыши	улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; снижает уровни экспрессии коллагенов I и III типов	[15]
miR-214-3p	миокард мыши; культура миофибробластов мыши	улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; подавляет экспрессию коллагенов I и III типов, α -SMA	[16]
miR-325-3p	миокард крысы, миокард мыши; культура фибробластов сердца крысы	подавляет экспрессию коллагена I и III типов, α -SMA, фибронектина, пролиферацию и миграцию фибробластов	[17]
miR-891a-3p	культура фетальных фибробластов сердца крысы	подавляет рост фибробластов и экспрессию коллагена I типа и CTGF	[18]
Let-7d	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	подавляет фиброгенез, снижает уровни α -SMA, фибронектина, CTGF, коллагенов I и III типов и отложение коллагена в миокарде; подавляет пролиферацию фибробластов, а также переход фибробластов в миофибробласты	[19]
Профибротические микроРНК			
miR-21	миокард мыши, человека; культура фибробластов сердца крысы	подавление miR-21 уменьшает проявления фиброза миокарда и содержание коллагена; способствует пролиферации фибробластов	[20, 21]
miR-25-3p	миокард мыши, миокард человека; культура фибробластов сердца мыши	повышает уровни экспрессии генов коллагенов I и III типов, α -SMA	[22]
miR-130a-3p	миокард мыши, миокард человека; культура фибробластов сердца крысы	регулирует уровни коллагенов I и III типов, α -SMA, CTGF, фибронектина, матриксной металлопротеиназы 9, а также переход фибробластов в миофибробласты	[23]
miR-145-3p	культура фетальных фибробластов сердца крысы	стимулирует рост фибробластов и экспрессию коллагена I типа, CTGF и α -SMA	[18]
miR-155	культура эмбриональных кардиомиоцитов крысы	повышает уровни экспрессии коллагена I типа и α -SMA	[24]
miR-223	миокард крысы; культура эмбриональных кардиомиоцитов крысы	регулирует уровни экспрессии коллагенов I и III типов; ингибирование miR-223 улучшает гистологическую картину фиброза миокарда	[25]

Примечание. CTGF – фактор роста соединительной ткани; α -SMA – α -актин гладких миоцитов.

Бонферрони. На второй итерации работы алгоритма был извлечён модуль, содержащий сигнальный путь «Клеточное старение» («Cellular Senescence»), и две связанных с ним микроРНК, hsa-miR-223-3p и miR-214-3p (показаны на рис. 1, в), однако вероятность извлечения модуля такой структуры мала; она оценивается нами в 0,62 с поправкой на множественные сравнения по Бонферрони (расчёты см. в онлайн-репозитории по ссылке https://github.com/GJOsmak/miRNET_fibrosis). По этой причине второй модуль мы относим к статистическому шуму и далее не рассматриваем.

Для выяснения конкретных механизмов, лежащих в основе микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов выявленного SMAD-модуля, по данным базы валидированных мишеней miRTarBase, мы проанализировали взаимодействия между входящими в него микроРНК с их ключевыми мРНК-мишенями (рис. 2). Анализ показал, что miR-24-3p связывается с мРНК наибольшего количества генов: *MYC*, *SP1*, *UBC*, *TFDP2*, *RBL1*, *NEDD4l* и *HDAC1*. При этом мРНК гена *MYC* имеет в своей последовательности сайты связывания для наибольшего числа микроРНК среди проанализированных нами: *let-7d-5p*, *miR-25-3p*, *miR-29b-3p*, *miR-21-5p*, *miR-130a-3p*, *miR-24-3p* и *miR-155-5p*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы провели проверку состоятельности предсказаний функций микроРНК, основанных на применении ранее предложенного нами алгоритма, который обобщает имеющиеся в открытом доступе данные по экспериментально валидированным мишеням микроРНК [9, 10]. Для такой проверки мы использовали набор микроРНК, для которых, согласно данным литературы, имеются экспериментальные свидетельства их вовлечённости в регуляцию процессов фиброза — одного из ключевых звеньев патогенеза ГКМП.

Исходя из данных научных статей, индексируемых в базе NCBI PubMed за 2008—2022 гг., мы отобрали 15 микроРНК, предположительно, вовлечённых в развитие фиброза миокарда (таблица). Однако для генов-мишеней трёх микроРНК (*hsa-miR-325*, *hsa-miR-145-3p* и *hsa-miR-891a-3p*) из-за недостатка данных не удалось построить сети взаимодействия, и эти микроРНК были исключены из рассмотрения. Анализ возможной функции остальных 12 микроРНК по предложенному нами алгоритму показал, что 10 из них, а именно:

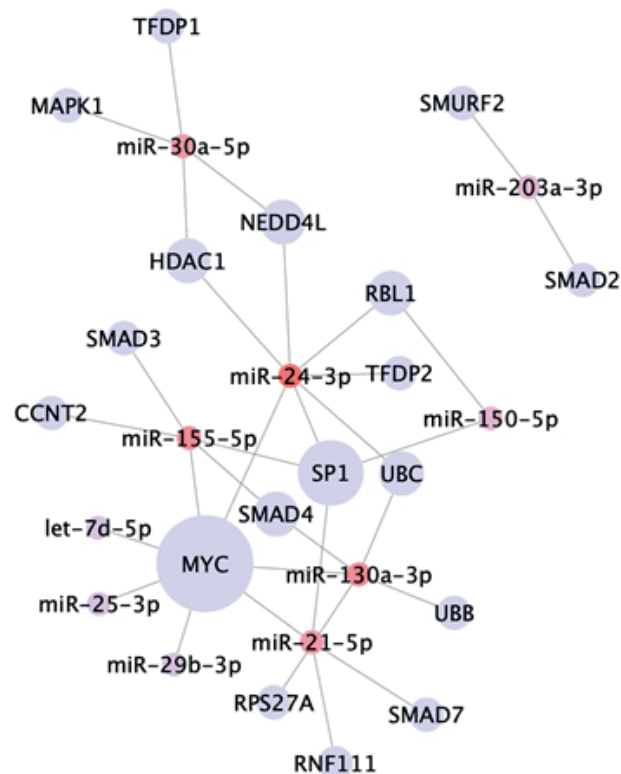


Рис. 2. Двудольный граф микроРНК и их ключевых генов-мишеней, перепредставленных среди генов SMAD-сигнального пути. Размер узла гена-мишени отображает входящую степень узла (число микроРНК, с которыми он связан), градиент от синего к красному — исходящую степень узла (количество генов-мишеней, с которыми связана микроРНК)

hsa-miR-21-5p, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-25-3p*, *hsa-miR-29-3p*, *hsa-miR-30a-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-150-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-203a-3p* и *hsa-let-7d-5p*, вероятно, вовлечены в регуляцию экспрессии генов SMAD-сигнального пути, кодирующих белки семейства SMAD — основных передатчиков сигналов для рецепторов суперсемейства TGF- β (трансформирующих факторов роста бета), которые критически важны для регуляции развития и роста клеток. При этом выявленные микроРНК регулируют SMAD-модуль, содержащий гены для трёх формирующих гетеротример белков (*SMAD2*, *SMAD3* и *SMAD4*) из 8-членного семейства SMAD. Белки *SMAD2* и *SMAD3* непосредственно передают сигналы от TGF- β -рецепторного комплекса, а *SMAD4* выполняет вспомогательную роль. Связываясь с двумя молекулами SMAD (*SMAD2* и/или *SMAD3*), *SMAD4* формирует гетеротример, который направляется в ядро для регуляции экспрессии генов [26].

Обобщение экспериментальных данных, которое было достигнуто с помощью нашего алгоритма, хорошо согласуется с представле-

ниями, согласно которым TGF- β -сигналинг занимает центральное место в развитии таких патологий сердца, как сердечная недостаточность, гипертрофия и фиброз миокарда, ремоделирование камер сердца [27]. Действительно, было показано, что активация TGF- β -рецепторного комплекса и последующая передача сигналов посредством SMAD2/SMAD3 регулирует экспрессию генов, связанных с фиброзом – генов металлопротеиназ, коллагенов, протеогликанов, интегринов и фактора роста соединительной ткани (CTGF) [27]. SMAD2 отвечает за подавление экспрессии этих генов, а SMAD3 – за их активацию [27].

В результате детализации возможных регуляторных механизмов, достигнутой при анализе сети взаимодействий молекул микроРНК с их экспериментально валидированными генами-мишенями, мы установили, что miR-24-3p регулирует наибольшее число генов, относящихся к обнаруженному нами SMAD-модулю; с другой стороны, мРНК гена *MYC* из этого модуля имеет наибольшее количество сайтов связывания разных микроРНК. Эти данные хорошо согласуются с представлениями о плейотропности и вырожденности регуляции посредством микроРНК. При этом miR-24-3p имеет сайты связывания не только на мРНК гена *MYC*, но и на мРНК других генов выявленного нами SMAD-модуля, в частности, *SP1*, *UBC*, *TFDP2*, *RBL1*, *NEDD4l* и *HDAC1* (рис. 2). Это наблюдение хорошо согласуется с данными о разнонаправленной регуляции посредством этой микроРНК TGF- β /SMAD-сигнального пути в процессах, связанных с фиброзом и дифференцировкой клеток [28–31]. При этом мы обнаружили, что ген *MYC* регулируется наибольшим числом рассматриваемых микроРНК. Этот ген относится к семейству регуляторных онкогенов, кодирующих транскрипционные факторы; возрастание его экспрессии ассоциировано с опухолевыми заболеваниями, поскольку при этом повышается экспрессия генов, участвующих в пролиферации клеток (база данных NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>). Известно также, что *MYC* контролирует транскрипцию генов при поляризации резидентных макрофагов в макрофаги типа M2 [32], которые запускают и поддерживают репарационные процессы, связанные с накоплением коллагена – главного компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани [33–35]. Описано, что сверхэкспрессия *MYC* провоцирует фиброз печени [36] и TGF- β -опосре-

дованный фиброз почек [37, 38]. Кроме того, показано, что экспрессия гена *MYC* повышена при гипертрофии миокарда, в частности, при гипертрофической кардиомиопатии ещё до появления основных симптомов заболевания [39–41]. Таким образом, выявленная нами роль *MYC* как ключевого гена-мишени микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда, хорошо согласуется с описанными свойствами этого гена.

Ранее [10] мы показали, что набор микроРНК, участвующих в гипертрофии миокарда, регулирует гены SMAD-сигнального пути и предположили, что это может вносить свой вклад в прогрессирование ремоделирования миокарда при ГКМП. Среди 12 микроРНК, анализируемых в цитируемой работе, только три оказались общими с теми микроРНК, которые были отобраны как ассоциированные с фиброзом для настоящего исследования – hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29-3p и hsa-miR-155-5p. Тот факт, что выводы о регуляции TGF- β /SMAD-сигнального пути двумя различными, мало пересекающимися наборами микроРНК, из которых один ассоциирован с гипертрофией миокарда, а другой – с фиброзом, были сделаны нами в двух независимых биоинформатических исследованиях, свидетельствует о том, что SMAD-сигнальный путь действительно служит ключевым объектом микроРНК-опосредованной регуляции патологических процессов при ГКМП. Полученные нами данные, после их экспериментального подтверждения, могли бы лечь в основу разработки новых терапевтических подходов для ГКМП.

Вклад авторов. О.О. Фаворова, Г.Ж. Осьмак – концепция и руководство работой; Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – проведение анализа; О.О. Фаворова, Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – обсуждение результатов исследования; Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – написание текста; О.О. Фаворова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00353).

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. Angelopoulos, A., Oikonomou, E., Vogiatzi, G., Antonopoulos, A., Tsalamandris, S., et al. (2021) MicroRNAs as biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy: current state of the art, *Curr. Med. Chem.*, **28**, 7400-7412, doi: 10.2174/0929867328666210405122703.
2. Marian, A. J., Salek, L., and Lutucuta, S. (2001) Molecular genetics and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy, *Minerva Med.*, **92**, 435-451.
3. Chiti, E., Di Paolo, M., Turillazzi, E., and Rocchi, A. (2021) MicroRNAs in hypertrophic, arrhythmogenic and dilated cardiomyopathy, *Diagnostics*, **11**, 1720, doi: 10.3390/diagnostics11091720.
4. Maron, B. J., Maron, M. S., Maron, B. A., and Loscalzo, J. (2019) Moving beyond the sarcomere to explain heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy: JACC review topic of the week, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **73**, 1978-1986, doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.061.
5. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 102-114, doi: 10.1038/nrg2290.
6. Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D155-D162, doi: 10.1093/nar/gky1141.
7. Scolari, F. L., Faganello, L. S., Garbin, H. I., Mattos, B. P. E., and Biolo, A. (2021) A systematic review of microRNAs in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Int. J. Cardiol.*, **327**, 146-154, doi: 10.1016/j.ijcard.2020.11.004.
8. Romaine, S. P. R., Tomaszewski, M., Condorelli, G., and Samani, N. J. (2015) MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians, *Heart*, **101**, 921-928, doi: 10.1136/heartjnl-2013-305402.
9. Osmak, G., Kiselev, I., Baulina, N., and Favorova, O. (2020) From miRNA target gene network to miRNA function: miR-375 might regulate apoptosis and actin dynamics in the heart muscle via Rho-GTPases-dependent pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, e9670, doi: 10.3390/ijms21249670.
10. Osmak, G., Baulina, N., Kiselev, I., and Favorova, O. (2021) MiRNA-regulated pathways for hypertrophic cardiomyopathy: network-based approach to insight into pathogenesis, *Genes (Basel)*, **12**, e2016, doi: 10.3390/genes12122016.
11. Wang, J., Huang, W., Xu, R., Nie, Y., Cao, X., et al. (2012) MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction, *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 2150-2160.
12. Zhang, Y., Huang, X. R., Wei, L. H., Chung, A. C., Yu, C. M., et al. (2014) miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling, *Mol. Ther.*, **22**, 974-985.
13. Yang, X. X., and Zhao, Z. Y. (2022) miR-30a-5p inhibits the proliferation and collagen formation of cardiac fibroblasts in diabetic cardiomyopathy, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **100**, 167-175, doi: 10.1139/cjpp-2021-0280.
14. Deng, P., Chen, L., Liu, Z., Ye, P., Wang, S., et al. (2016) MicroRNA-150 inhibits the activation of cardiac fibroblasts by regulating c-Myb, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 2103-2122, doi: 10.1159/000445568.
15. Yang, X., Li, X., Lin, Q., and Xu, Q. (2019) Up-regulation of microRNA-203 inhibits myocardial fibrosis and oxidative stress in mice with diabetic cardiomyopathy through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway via PIK3CA, *Gene*, **715**, e143995.
16. Zhu, W. S., Tang, C. M., Xiao, Z., Zhu, J. N., Lin, Q. X., et al. (2016) Targeting EZH1 and EZH2 contributes to the suppression of fibrosis-associated genes by miR-214-3p in cardiac myofibroblasts, *Oncotarget*, **7**, 78331-78342, doi: 10.18632/oncotarget.13048.
17. Wang, C. C., Shang, B. B., Yang, C. W., Liu, Y. F., Li, X. D., et al. (2018) MicroRNA-325 alleviates myocardial fibrosis after myocardial infarction via downregulating GLI1, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 5339-5346, doi: 10.26355/eurrev_201808_15735.
18. Verjans, R., Derks, W. J. A., and Korn, K. (2019) Functional screening identifies microRNAs as multi-cellular regulators of heart failure, *Sci. Rep.*, **9**, e6055, doi: 10.1038/s41598-019-41491-9.
19. Liang, H., Pan, Z., Zhao, X., Liu, L., Sun, J., et al. (2018) LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7d, *Theranostics*, **8**, 1180-1194.
20. Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts, *Nature*, **456**, 980-984, doi: 10.1038/nature07511.
21. Liu, S., Li, W., Xu, M., Huang, H., Wang, J., et al. (2014) Micro-RNA 21 Targets dual specific phosphatase 8 to promote collagen synthesis in high glucose-treated primary cardiac fibroblasts, *Can. J. Cardiol.*, **30**, 1689-1699.
22. Zeng, N., Wen, Y. H., Pan, R., Yang, J., Yan, Y. M., et al. (2021) Dickkopf 3: a novel target gene of miR-25-3p in promoting fibrosis-related gene expression in myocardial fibrosis, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **14**, 1051-1062, doi: 10.1007/s12265-021-10116-w.
23. Li, L., Bounds, K. R., Chatterjee, P., and Gupta, S. (2017) MicroRNA-130a, a potential antifibrotic target in cardiac fibrosis, *J. Am. Heart Assoc.*, **6**, e006763, doi: 10.1161/JAHA.117.006763.
24. Li, Y., Duan, J. Z., He, Q., and Wang, C. Q. (2020) miR155 modulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway, *Mol. Med. Rep.*, **22**, 4003-4016, doi: 10.3892/mmr.2020.11495.
25. Xu, D., Zhang, X., Chen, X., Yang, S., and Chen, H. (2020) Inhibition of miR-223 attenuates the NLRP3 inflammasome activation, fibrosis, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy, *Life Sci.*, **256**, e117980, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117980.
26. Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
27. Saadat, S., Noureddini, M., Mahjoubin-Tehran, M., Nazemi, S., Shojaie, L., et al. (2021) Pivotal role of TGF- β /Smad signaling in cardiac fibrosis: non-coding

- RNAs as effectual players, *Front. Cardiovasc. Med.*, **7**, e588347, doi: 10.3389/fcvm.2020.588347.
28. Ono, K. (2017) *Translating MicroRNAs to the Clinic* (Laurence, J., ed.) Acad. Press, pp. 259-281.
 29. Chen, Z., Lu, S., Xu, M., Liu, P., Ren, R., et al. (2017) Role of miR-24, furin, and transforming growth factor- β 1 signal pathway in fibrosis after cardiac infarction, *Med. Sci. Monit.*, **23**, 65-70.
 30. Sun, Y., Wang, H., Li, Y., Liu, S., Chen, J., et al. (2018) miR-24 and miR-122 negatively regulate the transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in skeletal muscle fibrosis, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **11**, 528-537, doi: 10.1016/j.omtn.2018.04.005.
 31. Roy, L., Bikorimana, E., Lapid, D., Choi, H., Nguyen, T., et al. (2015) MiR-24 is required for hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells, *PLoS Genet.*, **11**, e1004959, doi: 10.1371/journal.pgen.1004959.
 32. Pello, O. M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., et al. (2012) Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology, *Blood*, **119**, 411-421, doi: 10.1182/blood-2011-02-339911.
 33. Wermuth, P. J., and Jimenez, S. A. (2015) The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases, *Clin. Transl. Med.*, **4**, e2, doi: 10.1186/s40169-015-0047-4.
 34. Zhang, S. M., Wei, C. Y., Wang, Q., Wang, L., Lu, L., et al. (2021) M2-polarized macrophages mediate wound healing by regulating connective tissue growth factor via AKT, ERK1/2, and STAT3 signaling pathways, *Mol. Biol. Rep.*, **48**, 6443-6456, doi: 10.1007/s11033-021-06646-w.
 35. Wynn, T. A., and Vannella, K. M. (2016) Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis, *Immunity*, **44**, 450-462, doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
 36. Nevzorova, Y. A., Hu, W., Cubero, F. J., Haas, U., Freimuth, J., et al. (2013) Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 1765-1775, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.06.001.
 37. Shen, Y., Miao, N., Wang, B., Xu, J., Gan, X., et al. (2017) c-Myc promotes renal fibrosis by inducing integrin α -mediated transforming growth factor- β signaling, *Kidney Int.*, **92**, 888-899, doi: 10.1016/j.kint.2017.03.006.
 38. Zhou, Z., Ni, J., Li, J., Huo, C., Miao, N., et al. (2020) RIG-I aggravates interstitial fibrosis via c-Myc-mediated fibroblast activation in UUO mice, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **98**, 527-540, doi: 10.1007/s00109-020-01879-x.
 39. Wolfram, J. A., Lesnefsky, E. J., Hoit, B. D., Smith, M. A., and Lee, H. G. (2011) Therapeutic potential of c-Myc inhibition in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy, *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **2**, 133-144, doi: 10.1177/2040622310393059.
 40. Teare, D. (1958) Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults, *Heart*, **20**, 1-8, doi: 10.1136/hrt.20.1.1.
 41. Zhong, W., Mao, S., Tobis, S., Angelis, E., Jordan, M. C., et al. (2006) Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway, *EMBO J.*, **25**, 3869-3879, doi: 10.1038/sj.emboj.7601252.

REGULATION OF SMAD SIGNALING PATHWAY BY miRNAs ASSOCIATED WITH MYOCARDIAL FIBROSIS: *In silico* ANALYSIS OF TARGET GENE NETWORKS

M. Pisklova^{1,2*}, G. Osmak^{1,2}, and O. Favorova^{1,2}

¹ E. I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology,
121552 Moscow, Russia; e-mail: pisklova_maria@mail.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a hereditary heart disease caused by mutations in sarcomere genes, which is accompanied by myocardial fibrosis in combination with progressive heart failure and arrhythmias. Recent studies suggest that disturbances in the mechanisms of regulation of gene expression are also involved in the development of HCM. MiRNAs, short non-coding RNAs, belong to one of the types of such regulators. Usually, one miRNA regulates at the post-transcriptional level many target genes encoding various proteins, and therefore it is difficult to determine the role of particular miRNA in the disease pathogenesis. In this study, using the PubMed database, we selected 15 miRNAs whose expression is associated with myocardial fibrosis, one of the critical pathological processes in HCM. We then used an earlier developed algorithm to search *in silico* for the signaling pathways regulated by these miRNAs and found that 10 of them participate in the regulation of the TGF- β /SMAD signaling pathway. At the same time, among the genes of the SMAD signaling pathway, the target of most of the microRNAs under consideration is the *MYC* gene, which is involved in the development of fibrosis in some tissues. The conclusion about the regulation of the same TGF- β /SMAD signaling pathway by a set of other microRNAs associated with myocardial hypertrophy in HCM was made in our previous study. The coincidence of the results of two independent bioinformatic studies indicates that the SMAD signaling pathway is indeed a key object of the regulation of pathological processes in HCM. The results obtained make a substantial contribution to understanding the pathological processes underlying the development of HCM.

Keywords: fibrosis, miRNA, hypertrophic cardiomyopathy, HCM, *in silico* analysis, gene interaction network, TGF- β /SMAD signaling pathway

УДК 577.352.4

АЛИСПОРИВИР НОРМАЛИЗУЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

© 2022 В.С. Старинец^{1,2}, Д.А. Серов^{3,4}, Н.В. Пеньков⁴, Н.В. Белослудцева^{1,2}, М.В. Дубинин¹, К.Н. Белослудцев^{1,2*}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», 424001 Республика Марий Эл, Йошкар-Ола, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290 Московская обл., Пущино, Россия; электронная почта: bekonik@gmail.com

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук», 119991 Москва, Россия

⁴ Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», 142290 Московская обл., Пущино, Россия

Поступила в редакцию 11.04.2022

После доработки 16.05.2022

Принята к публикации 06.06.2022

В настоящей работе мы исследовали влияние алиспоривира (ингибитора митохондриальной поры) на развитие митохондриальной дисфункции при индукции гипергликемии в первичной культуре легочных эндотелиоцитов мыши. Продемонстрировано, что в условиях гипергликемии (30 мМ глюкоза в течение 24 часов) в эндотелиоцитах развивается митохондриальная дисфункция, которая выражается в увеличении генерации активных форм кислорода, индукции митохондриальных пор и падении мембранного потенциала. Все это приводит к снижению жизнеспособности клеток. Инкубация эндотелиоцитов с 5 мкМ алиспоривиром в гипергликемических условиях приводит к восстановлению жизнеспособности эндотелиоцитов, уровня трансмембранного потенциала и подавлению открытия митохондриальных пор до контрольных значений. Продемонстрировано, что в условиях гипергликемии может происходить увеличение митофагии в первичной культуре эндотелиоцитов легких мышей: наблюдалось увеличение степени колокализации митохондрий и лизосом и уровня экспрессии гена *Parkin*. Алиспоривир восстанавливал эти параметры до уровней, наблюдаемых в контрольных клетках. Гипергликемия приводила к увеличению в эндотелиоцитах экспрессии гена *Drp1*, ответственного за синтез белка, участвующего в процессе деления митохондрий. При этом алиспоривир достоверно не изменял уровень экспрессии данного гена. Обсуждаются механизмы влияния алиспоривира на митохондриальную дисфункцию легочных эндотелиоцитов мышей в условиях гипергликемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, алиспоривир, митохондриальная пора, гипергликемия, сахарный диабет, митофагия.

DOI: 10.31857/S0320972522070028, EDN: AVIJNU

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет — метаболическое заболевание, связанное либо с нарушением секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы (сахарный диабет I типа), либо с инсулинорезистентностью органов и тканей организма человека и животных (сахарный диабет

II типа). Вследствие этого происходит развитие гипергликемии, которая сопровождается нарушением белкового и липидного обмена. Эти нарушения приводят к патологическим изменениям в органах и тканях организма [1–5].

Общепризнано, что митохондриальная дисфункция является из одним процессов, вовлеченных в развитие сахарного диабета на клеточном уровне [6, 7]. Действительно, для многих органов и тканей, а также клеточных линий продемонстрировано, что сахарный диабет или гипергликемия приводят к усиленной генерации активных форм кислорода мито-

Принятые сокращения: Али — алиспоривир; АФК — активные формы кислорода; МХ — митохондрии; МРТ — mitochondrial permeability transition.

* Адресат для корреспонденции.

хондриями, нарушению процессов окислительного фосфорилирования и падению мембранного потенциала. Считается, что это связано с нарушением клеточного контроля качества митохондрий – внутриклеточной системы, ответственной за митофагию, митохондриальный биогенез и митохондриальную динамику [6–9].

Формирование во внутренней митохондриальной мембране Ca^{2+} -зависимой поры (mitochondrial permeability transition pore, MPT) является одним из важных признаков дисфункции митохондрий [10, 11]. MPT-пору определяют как белковый мегаканал, который формируется во внутренней и внешней мембране митохондрий в присутствии избыточной концентрации ионов Ca^{2+} , при развитии окислительного стресса и ряде других модуляторов. В условиях максимальной проводимости через этот канал могут транспортироваться соединения с молекулярной массой до 1500 Да, что приводит к коллапсу мембранного потенциала, нарушению ионного гомеостаза, набуханию органелл, их разрушению [12–14]. Несмотря на то что исследования митохондриальной поры ведутся уже более 50 лет, ее структура и механизм образования еще далеки от разрешения. Единственным доказанным белком, который принимает участие в индукции MPT-поры является циклофилин Д – белок митохондриального матрикса. Считается, что циклофилин Д является регулятором MPT-поры, а ингибиторы данного белка (циклоспорин А, алиспоривир) подавляют открытие MPT-поры в субмикромольных концентрациях [10–16]. В качестве гипотетических канальных белков внутренней мембраны сегодня рассматриваются транслокатор адениновых нуклеотидов и АТФ-синтаза [14].

Совокупность литературных данных позволяет говорить о том, что при развитии сахарного диабета наблюдаются тканеспецифические изменения чувствительности митохондрий к индукции MPT-поры [6]. Так, в ряде органов и тканей (скелетная мускулатура, сердце, поджелудочная железа) при развитии сахарного диабета происходит увеличение чувствительности митохондрий к открытию MPT-поры [6, 17–19]. В то же время митохондрии печени приобретают повышенную резистентность к образованию MPT-поры [20, 21]. Возможно, указанные различия и обуславливают тот факт, что фармакологическая и генетическая модуляция MPT-поры не всегда способствует возникновению терапевтического эффекта. Так, с одной стороны, нокаут циклофилина Д или его ингибирование не влияли на развитие диабетической нефропатии [22]. С другой стороны,

у мышей, нокаутированных по циклофилину Д, в условиях высокожировой диеты клетки скелетной мускулатуры проявляли способность к усиленному поглощению глюкозы [23], а ингибиторы MPT-поры снижали размер зоны инфаркта миокарда у диабетических животных при ишемии/реперфузии [6, 24].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что продолжительное (3 недели) введение ингибитора MPT-поры алиспоривира (неиммуносупрессорный аналог циклоспорина А) мышам с индуцированным сахарным диабетом приводит в скелетной и сердечной мускулатуре к снятию эффектов диабетической митохондриальной дисфункции. Более того, алиспоривир увеличивает скорость утилизации глюкозы из крови диабетических животных при проведении глюкозотолерантного теста [25, 26]. В настоящей работе мы продолжаем исследовать влияние алиспоривира на митохондриальную дисфункцию, индуцированную гипергликемией. Исследования на клеточном уровне часто раскрывают молекулярные и внутриклеточные механизмы, которые не могут быть обнаружены в экспериментах на животных. Таким образом, задачами настоящего исследования являлось: 1) определить влияние алиспоривира на жизнеспособность первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей при гипергликемии; 2) оценить влияние алиспоривира на индуцированную гипергликемией митохондриальную дисфункцию легочных эндотелиоцитов; 3) установить влияние алиспоривира на колокализацию митохондрий и лизосом в легочных эндотелиоцитах в условиях гипергликемии, тем самым определить возможное влияние агента на митофагию; 4) определить уровень экспрессии генов белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митофагию и митохондриальную динамику, в эндотелиоцитах легких в условиях гипергликемии в отсутствие и в присутствии алиспоривира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолирование и культивирование эндотелиальных клеток мыши. Изолирование эндотелиальных клеток из микрососудов легких мыши выполняли методом непрямой магнитной сепарации [27, 28]. В работе использованы мыши линии BALB/c (самцы, масса 20–22 г). Животные были умерщвлены методом цервикальной дислокации. В стерильных условиях легкие извлекали из грудной клетки, промывали в среде DMEM («Gibco», США) и измельчали хирургическими ножницами. После измельчения ткань

инкубировали в 0,2%-ном растворе коллагеназы типа II («Abscam», Великобритания) в течение 40 мин при 37 °С и постоянном перемешивании. Образцы ресуспендировали и пропускали через сито с диаметром пор 70 мкм («Greiner Bio-One», Австрия). К суспензии клеток добавляли 20%-ную сыворотку и далее двукратно центрифугировали при 500 g в течение 8 мин. Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере без солей кальция и магния с добавлением 2 мМ ЭДТА и антител против CD31 («Abscam», разведение 1 : 100) и инкубировали в течение 15 мин при постоянном перемешивании, затем отмывали центрифугированием при 500 g в течение 8 мин. После отмывки клетки инкубировали 15 мин с магнитными частицами, конъюгированными со вторичными антителами (разведение 1 : 100) («Thermo Fisher», США). Сепарацию CD31⁺ клеток выполняли с помощью магнитного штатива MagJET («Thermo Fisher»). Клетки пятикратно отмывали фосфатно-солевым буфером и высевали в культуральные флаконы, дно которых было предварительно обработано раствором 0,2%-ного желатина из кожи быка («Sigma-Aldrich», США). Полученные клетки культивировали по стандартному протоколу в среде DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В («Gibco») и 50 мкг/мл добавки для роста эндотелиальных клеток («Sigma-Aldrich»). Культура была получена путём объединения клеток от трёх животных [27]. В экспериментах были использованы клетки 7–10 пассажа с жизнеспособностью, оцениваемой по окрашиванию йодистым пропидием, не менее 98%. Круглые покровные стекла (диаметр 25 мм) по одному помещали в ячейки 6-луночных планшетов. Стекла обрабатывали раствором 0,2%-ного желатина, высушивали и наносили суспензию эндотелиальных клеток в среде культивирования. Культивировали клетки в течение 3 сут. до достижения конfluence 90% и выше.

Моделирование гипергликемии. Гипергликемию моделировали инкубацией клеток в среде культивирования с повышенной концентрацией глюкозы (30 мМ) в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) [29]. Контрольные клетки инкубировали 24 ч в среде культивирования с концентрацией глюкозы 5 мМ. Половину образцов инкубировали с 5 мкМ алиспоривиром («Medchemexpress», США), который добавляли в среду культивирования в виде раствора в DMSO (разведение 1 : 2000). Клетки без алиспоривира инкубировали 24 ч после добавления соответствующего объема DMSO.

Определение выживаемости клеток. Для оценки выживаемости клетки сразу после окончания инкубации трижды отмывали раствором Хенкса и инкубировали 30 мин с 5 мкг/мл витального красителя Hoechst 33342 и 5 мкМ йодистого пропидия («Thermo Fisher») при 37 °С. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью светодиодной системы визуализации, сконструированной на основе инвертированного микроскопа AE31E («Motic», Испания), оснащённого объективом Motic PLAN FLUAR 10× N.A. 0.3 [30]. Анализ выполняли с помощью программы Image J2, Fiji (NIH, США).

Определение митохондриального мембранного потенциала эндотелиоцитов. Для определения потенциала внутренней митохондриальной мембраны использовали флуоресцентный краситель родамин 123 («ThermoFisher»). Сразу после окончания инкубации клетки трижды отмывали раствором Хенкса с соответствующей концентрацией глюкозы и окрашивали родамином 123 (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны флуоресценции – 525 нм) в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С. После окончания инкубации трижды отмывали клетки раствором Хенкса. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью светодиодной системы визуализации, указанной выше. Все измерения были выполнены при постоянных значениях силы тока источника возбуждающего света (80 мА), времени экспозиции (1 с), коэффициента усиления (×623) и усреднении пикселей (2×2). Интенсивность флуоресценции родамина 123 выражали в виде отношения интенсивности флуоресценции в каждой точке (F) к усредненной интенсивности флуоресценции в базовых условиях (F₀). Для оценки мембранного потенциала добавляли 2 мкМ FCCP и оценивали изменение интенсивности флуоресценции. Для удобства сравнения данных между образцами мембранный потенциал выражали в процентах. За 100% принимали изменение интенсивности флуоресценции в контрольных клетках.

Определение колокализации митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах. Колокализацию митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах оценивали с помощью конфокальной микроскопии по колокализации в клетках флуоресцентных красителей MitoTracker DeepRed FM (200 нМ) и LysoTracker Green (50 нМ) («Thermo Fisher») [31].

Конфокальные изображения получали с помощью микроскопа DMI6000 («Leica», Германия). Аргонный лазер с длиной вол-

ны 488 нм использовали для возбуждения флуоресценции LysoTracker Green, которую измеряли при 505–530 нм. Для MitoTracker DeepRed использовали Ne/He лазер с длиной волны 638 нм, флуоресценцию измеряли при 650–680 нм. Анализ колокализации выполняли с помощью программного обеспечения Image J2, Fiji. Долю площади колокализации митохондрий и лизосом рассчитывали к общей площади митохондрий в поле зрения (принятой за 100%). Для каждого образца было проанализировано не менее 10 полей зрения. Для каждого экспериментального условия было выполнено 4 биологических повтора (покровное стекло с клетками отдельной культуры).

Определение наличия митохондриальной поры в эндотелиоцитах. Образование митохондриальной поры оценивали по флуоресценции кальцеина AM в присутствии 1 мМ CoCl_2 [32, 33]. После инкубации с исследуемыми агентами клетки трижды отмывали раствором Хенкса и инкубировали 30 мин при 37 °С в присутствии 1 мМ кальцеина AM, 200 нМ MitoTracker Red (для визуализации структуры митохондрий) и 1 мМ CoCl_2 . После окрашивания клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса и получали флуоресцентные изображения с использованием конфокального микроскопа DMI6000 («Leica»). Митохондрии идентифицировали с помощью флуоресценции MitoTracker Deep Red FM и измеряли интенсивность флуоресценции кальцеина AM в них (длина волны возбуждения – 494 нм, длина волны флуоресценции – 517 нм). Анализ изображений выполняли с помощью программы Image J2, Fiji. Интенсивность флуоресценции фона вычитали из интенсивности флуоресценции клеток. Интенсивность флуоресценции кальцеина AM рассчитывали относительно интенсивности флуоресценции MitoTracker Red. Для каждого экспериментального условия было выполнено 4 биологических повтора (по 2 покровных стекла с клетками отдельной культуры).

Определение окислительного стресса в эндотелиоцитах. Оценку уровня окислительного стресса проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Muse Cell Analyzer («Luminex», США). Для проведения цитофлуориметрии эндотелиоциты каждой группы открепляли от подложки с помощью раствора, содержащего трипсин (0,05%) и ЭДТА (0,53 мМ) в течение 10 мин при 37 °С. Открепленные клетки переносили в 5 мл среды DMEM с 10%-ной эмбриональ-

ной телячьей сывороткой для ингибирования трипсина, перемешивали и центрифугировали при 350 g в течение 8 мин, осадок ресуспендировали в 100 мкМ стерильного раствора Хенкса («ПанЭко», Россия). Для поддержания гипергликемических условий концентрацию глюкозы в растворе доводили до 30 мМ. Количественное измерение клеточной популяции, подвергшейся действию окислительного стресса, оценивали с использованием Muse Oxidative Stress Kit (MCH100111) («Luminex»). Все исследования проводили строго в соответствии с протоколом производителя.

Производство АФК также оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (H_2DCFDA) («Thermo Fisher»). Клетки окрашивали 20 мкМ H_2DCFDA в течение 30 мин при 37 °С. Далее клетки отмывали раствором Хенкса и анализировали с помощью светодиодной системы визуализации при длине волны возбуждения 490 нм и эмиссии – 520 нм.

ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии генов белков, ответственных за митофагию, митохондриальный биогенез и митохондриальную динамику, определяли методом ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции [26]. Тотальную РНК из образцов клеточной суспензии получали с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора QuantStudio 1 («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), где в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя используется SYBR Green II. Выбор и анализ ген-специфичных праймеров проводили с использованием Primer-BLAST [34] (последовательность олигонуклеотидов представлена в таблице). Нормирование проводили относительно гена *Rplp2*. Расчет $\Delta\Delta\text{Ct}$ проводили по формуле $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (Контроль) – ΔCt (опыт); каждое значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (исследуемый ген) – Ct (*Rplp2*) [35].

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью GraphPad Prism 7.0 с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Для последующего сравнения средних значений дисперсионного комплекса использовали тест Тьюки. Результаты представлены в виде среднего значения \pm среднего квадратичного отклонения ($n = 4–8$, где n – число экспериментов с разными культурами).

Список ген-специфичных праймеров

Ген	Прямой (5'→3')	Обратный (5'→3')
<i>Drp1</i>	TTACAGCACACAGGAATTGT	TTGTCACGGGCAACCTTTTA
<i>Mfn2</i>	CACGCTGATGCAGACGGAGAA	ATCCCAGCGGTTGTTCAGG
<i>Ppargc1a</i>	CTGCCATTGTTAAGACCGAG	GTGTGAGGAGGGTTCATCGTT
<i>Pink1</i>	TTGCCCCACACCCTAACATC	GCAGGGTACAGGGGTAGTTCT
<i>Parkin</i>	AGCCAGAGGTCCAGCAGTTA	GAGGGTTGCTTGTTTGCAGG
<i>Rplp2</i>	CGGCTCAACAAGGTCATCAGTGA	AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Алиспоривир увеличивает жизнеспособность эндотелиоцитов легких мышей при гипергликемии. Анализ жизнеспособности клеток первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей, содержащихся в условиях нормо- (5 мМ) и гипергликемии (30 мМ) в отсутствие и в присутствии 5 мкМ алиспоривира, представлен на рис. 1 и рис. S1 в Приложении. Данная концентрация алиспоривира была выбрана по результатам серии предварительных экспериментов с использованием суспензии изолированных митохондрий (данные не опубликованы). Продемонстрировано, что инкубация клеток в гипергликемических условиях в течение 24 ч приводила к достоверному снижению числа живых клеток. Присутствие в инкубационной среде алиспоривира приводило к увеличению жизнеспособности эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии.

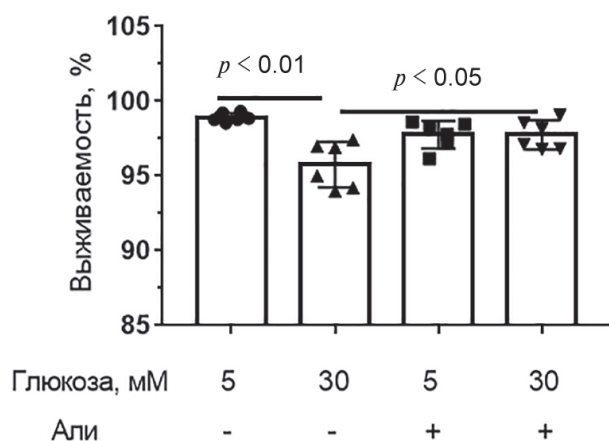


Рис. 1. Влияние алиспоривира (Али, 5 мкМ) на выживаемость эндотелиоцитов легких мышей в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6$)

Алиспоривир подавляет развитие митохондриальной дисфункции в эндотелиоцитах легких мышей при гипергликемии. В предыдущих работах мы показали, что введение алиспоривира *in vivo* мышам с экспериментальным сахарным диабетом II типа нормализует функционирование митохондрий сердца и скелетной мускулатуры [25, 26]. В настоящей работе мы оценили влияние алиспоривира на функционирование митохондрий в первичной культуре эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии. Как показано на рис. 2, у эндотелиоцитов, инкубированных в среде с высокой концентрацией глюкозы (30 мМ), был снижен мембранный потенциал по сравнению с контрольными клетками (5 мМ глюкоза). Инкубация клеток с 5 мкМ алиспоривиром в условиях гипергликемии приводила к восстановлению мембранного митохондриального потенциала до контрольных значений (рис. S2 в Приложении).

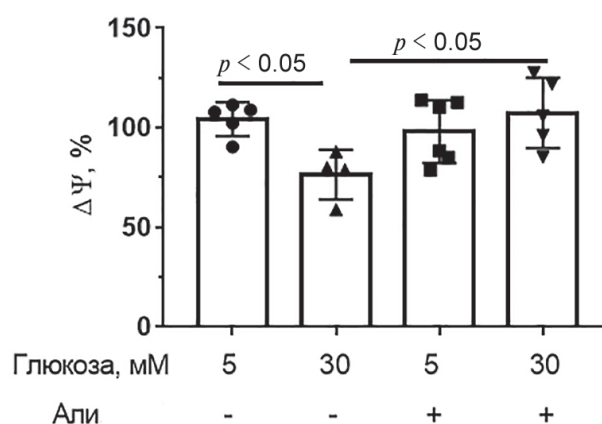


Рис. 2. Влияние алиспоривира (Али, 5 мкМ) на $\Delta\Psi$ (%) митохондрий эндотелиоцитов легких мышей в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

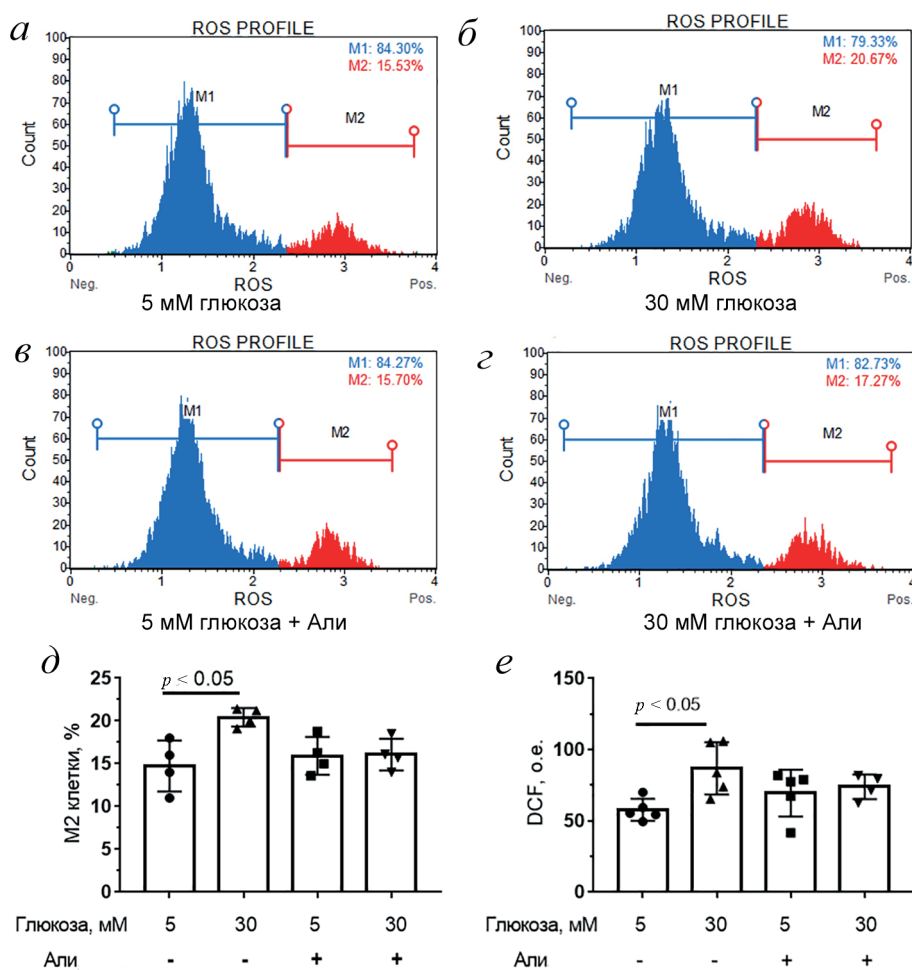


Рис. 3. Влияние алиспоривира (Али, 5 мкМ) (в, г) на продукцию АФК (ROS) легочными эндотелиоцитами в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) (а, в) и гипергликемии (30 мМ глюкоза) (б, г). а–г – Типичные диаграммы распределения популяции клеток четырех экспериментальных групп; д – расчёт АФК-положительных клеток (%) в экспериментальных группах; е – уровень флуоресценции DCF в клетках четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4-5$)

Параллельно с митохондриальной деполяризацией в условиях гипергликемии развивается окислительный стресс. На рис. 3, а–г представлены данные проточной цитофлуориметрии по количеству АФК-положительных (условный пик М2 – популяция клеток, у которых вызванная супероксидом флуоресценция выше установленного порога) и АФК-негативных клеток (условный пик М1 – популяция клеток, у которых вызванная супероксидом флуоресценция ниже установленного порога) в каждой группе. Можно видеть, что в этих условиях наблюдается увеличение АФК-положительных клеток, что свидетельствует об увеличенной генерации супероксид-аниона в эндотелиоцитах. В присутствии алиспоривира мы не обнаружили достоверного снижения АФК-положительных клеток в условиях гипергликемии, хотя наблюдалась тенденция к снижению (рис. 3, д). Подобные результаты были получены методом флуоресцентной микроско-

пии с использованием зонда DCF (рис. 3, е и рис. S3 в Приложении).

Алиспоривир является ингибитором образования МРТ-поры [15]. В связи с этим в следующей части работы мы определили его влияние на открытие МРТ-поры в клетках первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей, подверженных действию гипергликемии. Открытие МРТ-поры в митохондриях эндотелиоцитов оценивали по флуоресценции кальцеина в митохондриях в присутствии ионов кобальта. При нарушении целостности мембраны митохондрий, в том числе и при образовании МРТ-поры, CoCl_2 проникает в митохондрии и вызывает тушение флуоресценции кальцеина. Таким образом, по снижению интенсивности флуоресценции кальцеина в митохондриях можно судить об открытии МРТ-поры. На рис. 4, а представлена типичная картина легочных эндотелиоцитов в четырех экспериментальных условиях, окрашенных кальцеи-

ном в присутствии ионов кобальта. Стоит отметить, что МРТ-пора может находиться как в высокопроводящем, так и в низкопроводящем состоянии [12]. При этом кобальт может проникнуть в митохондриальный матрикс в обоих состояниях. Таким образом, можно

предположить, что тушение флуоресценции, наблюдаемое в контрольных клетках, связано со спонтанным низкопроводящим состоянием МРТ-поры. Можно видеть, что в условиях повышенного содержания глюкозы наблюдается значительное снижение интенсивности

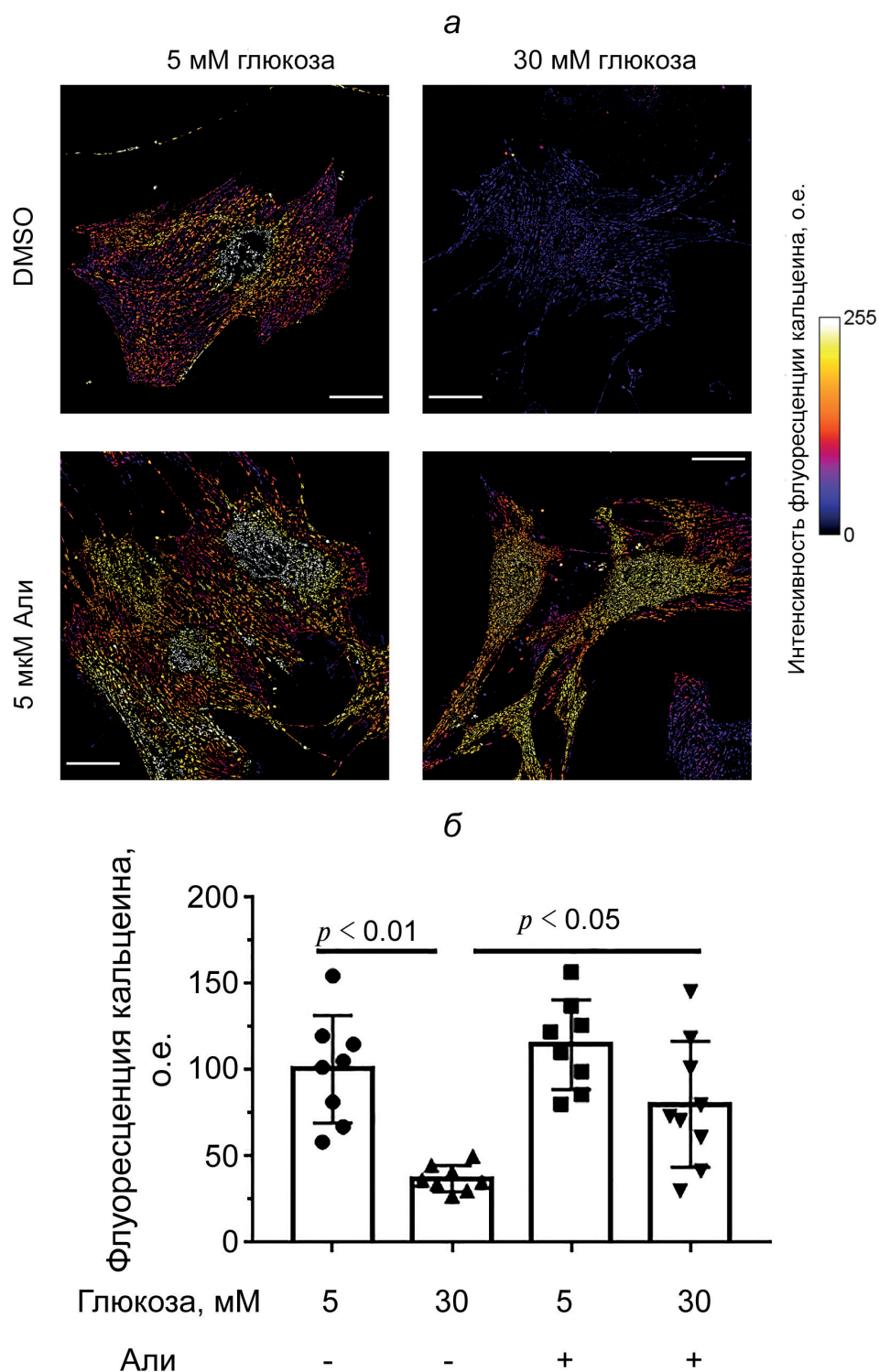


Рис. 4. Образование МРТ-поры в эндотелиоцитах легких мышей. *а* – Типичные фотографии флуоресценции митохондриального кальцеина в присутствии CoCl_2 в эндотелиоцитах экспериментальных групп. Шкала – 40 мкм. *б* – Интенсивность флуоресценции кальцеина в митохондриях эндотелиоцитов легких мышей четырех экспериментальных групп. Али – алиспоривир. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

флуоресценции кальцеина в митохондриях эндотелиоцитов по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, а, б). Это свидетельствует в пользу того, что в условиях гипергликемии увеличивается активность открытия МРТ-поры в эндотелиоцитах.

Инкубация клеток с алиспоривиром в условиях гипергликемии приводит к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции кальцеина в митохондриях по сравнению с митохондриями эндотелиоцитов, инкубированных лишь в присутствии 30 мМ глюкозы (рис. 4, б). Это говорит о том, что алиспоривир ингибирует открытие МРТ-пор во внутренней мембране митохондрий эндотелиоцитов, экспонированных в условиях гипергликемии.

Также была рассчитана доля митохондрий, не окрашенных кальцеином. В контроле содержание таких митохондрий составляет $9,5 \pm 2,1\%$. В условиях гипергликемии доля таких митохондрий достоверно увеличивалась до $23,2 \pm 6,6\%$. В присутствии алиспоривира наблюдалась тенденция к снижению количества не окрашенных кальцеином митохондрий до $17,6 \pm 6,2\%$. Это также служит подтверждением того, что гипергликемия стимулирует открытие МРТ-поры в эндотелиоцитах, а алиспоривир ингибирует этот процесс.

Алиспоривир подавляет индуцированную гипергликемией колокализацию митохондрий и лизосом (митофагию). Одним из адаптационных ответов на гипергликемию и пониженный мембранный потенциал в клетке является митофагия (аутофагия митохондрий) [6, 36]. В настоящей работе мы оценивали уровень митофагии по степени колокализации митохондрий и лизосом, используя метод двойного окрашивания клеток (MitoTracker Deep Red FM и LysoTracker Green). Было обнаружено, что в условиях 24-часовой гипергликемии степень колокализации митохондрий и лизосом достоверно увеличивается, что может свидетельствовать об усилении митофагии. В этих условиях инкубация эндотелиоцитов легких мышей с 5 мкМ алиспоривиром приводила к восстановлению уровня колокализации митохондрий и лизосом до контрольных значений (рис. 5).

Влияние алиспоривира на изменения в условиях гипергликемии уровня мРНК белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митохондриальную динамику и митофагию. В следующей части работы мы оценивали уровень экспрессии генов белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митофагию и митохондриальную динамику. Показано, что при гипергликемии происходит достоверное

увеличение уровня экспрессии *Drp1*, что может косвенно свидетельствовать об увеличении содержания белка Drp1, участвующего в процессах деления митохондрий (рис. 6). Инкубация клеток с 5 мкМ алиспоривиром в условиях гипергликемии не приводила к достоверным изменениям уровня экспрессии этого гена, хотя наблюдалась тенденция к восстановлению к контрольным значениям. Во всех исследуемых группах не наблюдалось достоверных различий по уровню экспрессии гена *Ppargc1a*, ответственного за синтез PGC1- α , белка, участвующего в митохондриальном биогенезе, и гена *Mfn2*, кодирующего митофузин 2, белок, участвующий в процессе слияния митохондрий. Стоит отметить, что в гипергликемических условиях достоверно увеличивается экспрессия *Parkin* (но не *Pink1*), ответственного за синтез белка, участвующего в митофагии. Это косвенно подтверждает описанные выше результаты, показывающие, что в условиях гипергликемии (30 мМ глюкоза в течение 24 ч) в эндотелиоцитах легких мышей наблюдается индукция митофагии. Добавление 5 мкМ алиспоривира к клеткам, экспонируемым в 30 мМ глюкозе, приводит к достоверному снижению экспрессии *Parkin* до контрольных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митохондриальная дисфункция является одним из основных проявлений развития сахарного диабета [6]. В ряде исследований показано, что митохондриально-направленная генная или фармакологическая терапия восстанавливает структурно-функциональные параметры митохондрий, снижает вероятность осложнений сахарного диабета, в том числе приводя к увеличению чувствительности к инсулину тканей и органов и гипогликемическому действию [23, 25, 37]. В предыдущих работах мы показали, что продолжительная терапия диабетических мышей алиспоривиром (ингибитором МРТ-поры) приводит как к снижению митохондриальной дисфункции в скелетной и сердечной мускулатуре, так и к увеличению скорости утилизации глюкозы из крови при проведении глюкозотолерантного теста [25]. В настоящей работе мы исследовали внутриклеточные механизмы, которые могут лежать в основе защитного действия алиспоривира от повреждений, опосредованных высоким уровнем глюкозы, на эндотелиоциты легких мышей.

Как продемонстрировано в настоящей работе, экспозиция легочных эндотелиоцитов в условиях гипергликемии приводила к разви-

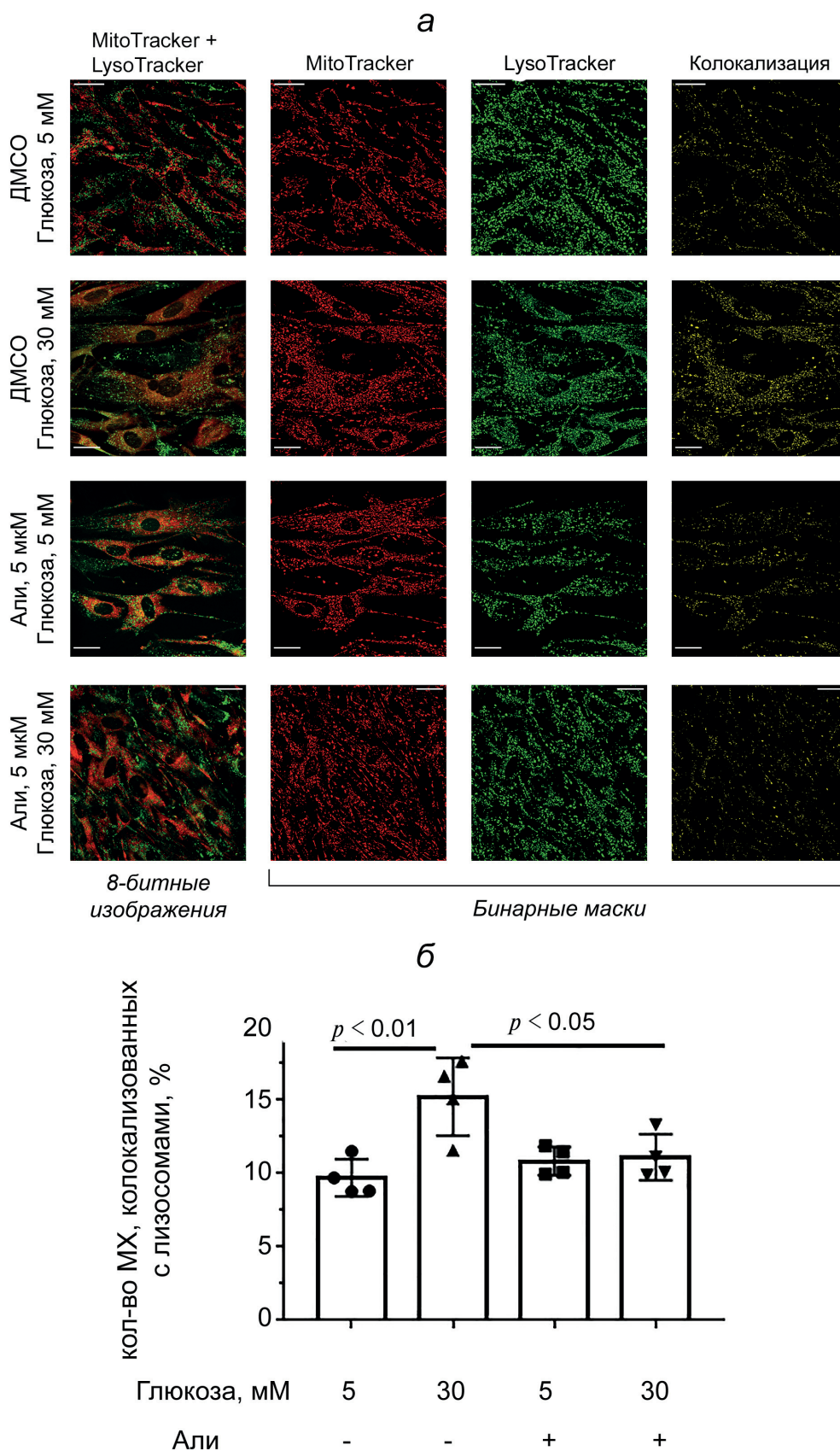


Рис. 5. Колокализация митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Степень колокализации митохондрий и лизосом определяли с использованием двойного окрашивания клеток MitoTracker Deep Red FM и LysoTracker Green. *а* – Представлены 8-битные изображения и бинарные маски каждого красителя и их колокализация. *б* – Количество митохондрий (МХ) (%), колокализованных с лизосомами в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения ± стандартное отклонение ($n = 4$)

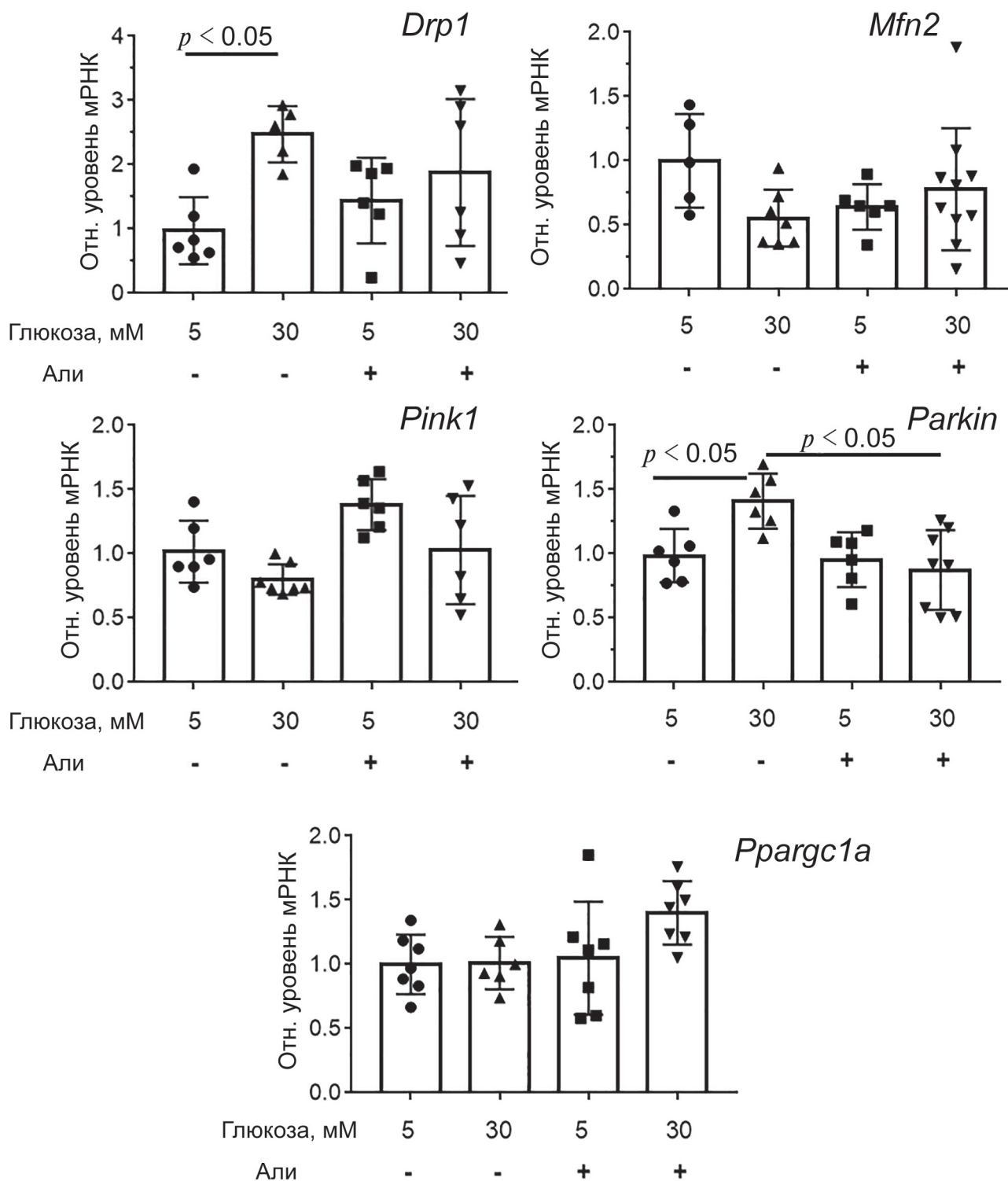


Рис. 6. Относительный уровень мРНК *Drp1*, *Mfn2*, *Pink1*, *Parkin* и *Ppargc1a* в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6-8$)

тию митохондриальной дисфункции, которая выражалась в повышенной генерации АФК, индукции МРТ-поры и, как следствие этих факторов, митохондриальной деполяризации (рис. 2–5). Эти нарушения функционирования

митохондрий могут лежать в основе клеточной гибели. Действительно, в условиях гипергликемии наблюдалось снижение жизнеспособности легочных эндотелиоцитов (рис. 1). Инкубация клеток с алиспоривиром (5 мкМ) в

гипергликемических условиях в значительной степени устраняет развитие признаков митохондриальной дисфункции. Установлено, что происходит снижение числа пермеабилizованных митохондрий в эндотелиоцитах вследствие открытия МРТ-поры и, следовательно, восстановление трансмембранного потенциала митохондрий, который становится сравнимым с митохондриальным потенциалом контрольных клеток. Мы не смогли зафиксировать достоверное снижение продукции АФК в присутствии алиспоривира в гипергликемических условиях (наблюдался лишь тренд к снижению продукции АФК по сравнению с гипергликемическими условиями). Тем не менее нормализация описанных выше митохондриальных функций алиспоривиром приводила к увеличению числа выживших клеток в условиях гипергликемии.

Считается, что снижение трансмембранного потенциала в митохондриях является одним из факторов запуска митофагии [31, 38]. В наших экспериментах в условиях гипергликемии и сниженного мембранного потенциала наблюдалось усиление колокализации митохондрий и лизосом и увеличение в эндотелиоцитах экспрессии участвующего в митофагии гена *Parkin*. Важно отметить, что эти методические подходы являются косвенными доказательствами митофагии, однако они позволяют предполагать ее активацию в условиях гипергликемии, что подтверждается литературными данными. Известно, что на стадии преддиабета наблюдается активация митофагии, тогда как на стадии сахарного диабета II типа – ингибирование данного процесса [6, 39]. При этом активация митофагии рассматривается в качестве адаптивного ответа. По-видимому, экспозиция первичной культуры эндотелиоцитов мыши в течение 24 ч в среде, содержащей 30 мМ глюкозу, индуцирует снижение жизнеспособности клеток и развитие митохондриальной дисфункции. Однако при этом в клетках альтернативно могут активироваться процессы (в частности, митофагия), препятствующие этому негативному сценарию.

Инкубация клеток в условиях гипергликемии с алиспоривиром приводила к тому, что уровень колокализации митохондрий и лизосом, а также уровень экспрессии гена *Parkin* становились неотличимы от наблюдаемых в контрольных клетках. Таким образом, можно предположить, что алиспоривир в гипергликемических условиях препятствует не только образованию МРТ-поры и снижению мембранного митохондриального потенциала, но и, возможно, запуску митофагии в эндотелиоци-

тах. Для доказательства этого предположения необходимо провести дополнительные исследования по определению митофагии.

Можно дискутировать о том, насколько полезным для организма будет отсутствие такого адаптивного ответа, как митофагия, при развитии сахарного диабета, однако проведенные нами предыдущие исследования позволяют говорить о том, что алиспоривир оказывает терапевтическое воздействие в ходе продолжительного введения диабетическим животным [25, 26]. Мы продемонстрировали, что в сердце диабетических мышей наблюдается снижение экспрессии генов *Pink1* и *Parkin*, а продолжительное (в течение 3 недель) введение диабетическим животным алиспоривира приводило к нормализации уровня экспрессии этих генов [26].

Как показано в настоящей работе, помимо изменения экспрессии гена *Parkin*, гипергликемия вызывает увеличение содержания мРНК белка *Drp1*, ответственного за деление митохондрий. Эти результаты косвенно подтверждают имеющиеся в литературе данные, что при развитии сахарного диабета у человека и животных, а также моделировании гипергликемии на клеточных культурах наблюдается фрагментирование митохондриальной сети [6–8]. В наших условиях алиспоривир не смог достоверно восстановить уровень мРНК *Drp1* до контрольных значений.

Как было сказано выше, исследования на клеточном уровне позволяют определить механизмы и таргетные молекулы, которые не могут быть обнаружены в экспериментах на животных. Алиспоривир, как и его иммуносупрессорный аналог циклоспорин А, имеет несколько мишеней [40, 41]. Помимо митохондриального циклофилина Д, алиспоривир способен взаимодействовать с цитоплазматическим циклофилином А [41]. С этим действием связывают его способность подавлять в клетках репликацию различных вирусов, в том числе и SARS-Cov-2 [42]. Поэтому полученные в настоящей работе эффекты могут быть обусловлены не только действием данного агента на митохондрии. Однако очевидно, что алиспоривир как в экспериментах *in vivo* на животных, так и в экспериментах на клеточной культуре подавляет развитие митохондриальной дисфункции при сахарном диабете и способствует облегченному течению заболевания.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00120).

Благодарности. В работе использовали оборудование (конфокальный микроскоп DM16000, «Leica», Германия) центра коллективного пользования ИБК РАН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными выполняли в соот-

ветствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и принципами Хельсинкской декларации (2000). Все протоколы были одобрены этической комиссией ИТЭБ РАН (протокол № 6/202 от 08.02.2021).

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- American Diabetes Association Professional Practice Committee (2022) 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022, *Diab. Care*, **45** (Suppl 1), S17-S38, doi: 10.2337/dc22-S002.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., et al. (2015) Type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **1**, 15019, doi: 10.1038/nrdp.2015.19.
- Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., et al. (2017) Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis, *Diabetes*, **66**, 241-255, doi: 10.2337/db16-0806.
- Roden, M., and Shulman, G. I. (2019) The integrative biology of type 2 diabetes, *Nature*, **576**, 51-60, doi: 10.1038/s41586-019-1797-8.
- Nolan, C.J., Prentki, M. (2019) Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **16**, 118-127, doi: 10.1177/1479164119827611.
- Belosludtsev, K. N., Belosludtseva, N. V., Dubinin, M. V. (2020) Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-dependent permeability transition pore, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6559, doi: 10.3390/ijms21186559.
- Montgomery, M. K., and Turner, N. (2015) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: An update, *Endocr. Connect.*, **4**, R1-R15, doi: 10.1530/EC-14-0092.
- Fujimaki, S., and Kuwabara, T. (2017) Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, E2147, doi: 10.3390/ijms18102147.
- Dai, W., Lu, H., Chen, Y., Yang, D., Sun, L., and He, L. (2021) The loss of mitochondrial quality control in diabetic kidney disease, *Front Cell Dev Biol.*, **9**, 706832, doi: 10.3389/fcell.2021.706832.
- Белослудцев К. Н., Дубинин М. В., Белослудцева Н. В., Миронова Г. Д. (2019) Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки, *Биохимия*, **84**, 759-775, doi: 10.1134/S0006297919060026.
- Bonora, M., Paternani, S., Ramaccini, D., Morciano, G., Pedriali, G., et al. (2020) Physiopathology of the permeability transition pore: molecular mechanisms in human pathology, *Biomolecules*, **10**, 998, doi: 10.3390/biom10070998.
- Neginskaya, M. A., Pavlov, E. V., and Sheu, S. S. (2021) Electrophysiological properties of the mitochondrial permeability transition pores: Channel diversity and disease implication, *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.*, **1862**, 148357, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148357.
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139-176, doi: 10.1016/0304-4157(95)00003-a.
- Bernardi, P., Carraro, M., and Lippe, G. (2021) The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.16254.
- Šileikytė, J., and Forte, M. (2016) Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition, *Biochim Biophys Acta*, **1857**, 1197-1202, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.016.
- Efimov, S. V., Dubinin, M. V., Kobchikova, P. P., Zgadzay, Y. O., Khodov, I. A., et al. (2020) Comparison of cyclosporin variants B-E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 1054-1060, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.184.
- Oliveira, P. J., Seica, R., Coxito, P. M., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., et al. (2003) Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats, *FEBS Lett.*, **554**, 511-514, doi: 10.1016/s0014-5793(03)01233-x.
- Lablanche, S., Cottet-Rousselle, C., Lamarche, F., Benhamou, P. Y., Halimi, S., et al. (2011) Protection of pancreatic INS-1 β -cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin, *Cell Death Dis.*, **2**, e134, doi: 10.1038/cddis.2011.15.
- Monaco, C., Hughes, M. C., Ramos, S. V., Varah, N. E., Lamberz, C., et al. (2018). Altered mitochondrial bioenergetics and ultrastructure in the skeletal muscle of young adults with type 1 diabetes, *Diabetologia*, **61**, 1411-1423, doi: 10.1007/s00125-018-4602-6.
- Ferreira, F. M., Seica, R., Oliveira, P. J., Coxito, P. M., Moreno, A. J., et al. (2003) Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: Role of coenzyme Q and cardiolipin contents,

- Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 113-120, doi: 10.1016/j.bbadis.2003.08.001.
21. Belosludtsev, K. N., Starinets, V. S., Belosludtsev, M. N., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., et al. (2021) Chronic treatment with dapagliflozin protects against mitochondrial dysfunction in the liver of C57BL/6NCRl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Mitochondrion*, **59**, 246-254, doi: 10.1016/j.mito.2021.06.008.
 22. Lindblom, R., Higgins, G. C., Nguyen, T. V., Arnstein, M., Henstridge, D. C., et al. (2020) Delineating a role for the mitochondrial permeability transition pore in diabetic kidney disease by targeting cyclophilin D, *Clin. Sci.*, **134**, 239-259, doi: 10.1042/CS20190787.
 23. Taddeo, E. P., Laker, R. C., Breen, D. S., Akhtar, Y. N., Kenwood, B. M., et al. (2013) Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle, *Mol. Metab.*, **3**, 124-134, doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.003.
 24. Najafi, M., Farajnia, S., Mohammadi, M., Badalzadeh, R., Ahmadi Asl, N., et al. (2014) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore restores the cardioprotection by postconditioning in diabetic hearts, *J. Diabetes Metab. Disord.*, **13**, 106, doi: 10.1186/s40200-014-0106-1.
 25. Belosludtsev, K. N., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., et al. (2021) Alisporivir treatment alleviates mitochondrial dysfunction in the skeletal muscles of C57BL/6NCRl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9524, doi: 10.3390/ijms22179524.
 26. Belosludtseva, N. V., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., Serov, D. A., Astashev, M. E., et al. (2021) Effect of the MPT pore inhibitor alisporivir on the development of mitochondrial dysfunction in the heart tissue of diabetic mice, *Biology (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/biology10090839.
 27. Sobczak, M., Dargatz, J., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (2010) Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice, *J. Vis. Exp.*, **46**, e2316, doi: 10.3791/231.
 28. Serov, D. A., Tankanag, A. V., and Astashev, M. E. (2022) Low frequency oscillations of murine skin microcirculations and periodic changes of $[Ca^{2+}]_i$ and $[NO]_i$ levels in murine endotheliocytes: an effect of provocative tests, *Cell Biol. Int.*, **46**, 427-442, doi: 10.1002/cbin.11743.
 29. Lee, W. C., Chau, Y. Y., Ng, H. Y., Chen, C. H., Wang, P. W., et al. (2019) Empagliflozin protects HK-2 cells from high glucose-mediated injuries via a mitochondrial mechanism, *Cells*, **8**, 1085, doi: 10.3390/cells8091085.
 30. Serov, D., Tikhonova, I., Safronova, V., and Astashev, M. (2021) Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression, *Cell Biol. Int.*, **45**, 1533-1545, doi: 10.1002/cbin.11593.
 31. Berezhnov, A. V., Soutar, M. P., Fedotova, E. I., Frolova, M. S., Plun-Favreau, H., et al. (2016) Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy, *J. Biol. Chem.*, **291**, 8701-8708, doi: 10.1074/jbc.M115.691774.
 32. Sasaki, K., Donthamsetty, R., Heldak, M., Cho, Y. E., Scott, B. T., et al. (2012) VDAC: old protein with new roles in diabetes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, 1055-1060, doi: 10.1152/ajpcell.00087.2012.
 33. Zhao, Z., Gordan, R., Wen, H., Fefelova, N., Zang, W. J., et al. (2013) Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca flux in mouse cardiomyocytes, *PLoS One*, **8**, e80574, doi: 10.1371/journal.pone.0080574.
 34. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., et al. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
 35. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 36. Onphachanh, X., Lee, H. J., Lim, J. R., Jung, Y. H., Kim, J. S., et al. (2017) Enhancement of high glucose-induced PINK1 expression by melatonin stimulates neuronal cell survival: Involvement of $MT_2/Akt/NF-\kappa B$ pathway, *J. Pineal Res.*, **63**, doi: 10.1111/jpi.12427.
 37. Benton, C. R., Holloway, G. P., Han, X. X., Yoshida, Y., Snook, L. A., et al. (2010) Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats, *Diabetologia*, **53**, 2008-2019, doi: 10.1007/s00125-010-1773-1.
 38. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J. Cell Biol.*, **183**, 795-803, doi: 10.1083/jcb.200809125.
 39. Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U. N., and Dhawan, V. (2017) Alterations in mitochondrial oxidative stress and mitophagy in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus, *Front. Endocrinol.*, **8**, 347, doi: 10.3389/fendo.2017.00347.
 40. Dubinin, M. V., Sharapov, V. A., Ilzorkina, A. I., Efimov, S. V., Klochkov, V. V., et al. (2022) Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, **1864**, 183972, doi: 10.1016/j.bbamem.2022.183972.
 41. Di Lisa, F., Carpi, A., Giorgio, V., and Bernardi, P. (2011) The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 1316-1322, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.031.
 42. Softic, L., Brillet, R., Berry, F., Ahnou, N., Nevers, Q., et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 infection by the cyclophilin inhibitor Alisporivir (Debio 025), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00876-20, doi: 10.1128/AAC.00876-20.

ALISPORIVIR NORMALIZES MITOCHONDRIAL FUNCTION OF PRIMARY MOUSE LUNG ENDOTHELIAL CELLS UNDER CONDITIONS OF HYPERGLYCEMIA

V. S. Starinets^{1,2}, D. A. Serov^{3,4}, N. V. Penkov⁴, N. V. Belosludtseva^{1,2},
M. V. Dubinin¹, and K. N. Belosludtsev^{1,2*}

¹ Mari State University, 424001 Yoshkar-Ola, Mari El, Russia

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: bekonik@gmail.com

³ Prokhorov General Physics Institute RAS, Biophotonics Center, 119991 Moscow, Russia

⁴ Institute of Cell Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

The present work shows the effect of alisporivir (a mitochondrial permeability transition pore inhibitor) on the development of mitochondrial dysfunction under hyperglycemic conditions in a primary culture of mouse lung endothelial cells. We have demonstrated that hyperglycemia (30 mM glucose for 24 h) leads to a decrease in the viability of pulmonary endotheliocytes. Hyperglycemia causes mitochondrial dysfunction, manifested by a drop of membrane potential, an increase in superoxide anion generation and mitochondrial pore (MPT pore) opening activity. Incubation of endothelial cells with 5 μ M alisporivir under hyperglycemic conditions leads to an increase in cell viability, restoration of the membrane potential level and MPT pore opening activity to control values. Hyperglycemia leads to increased mitophagy in lung endothelial cells: we observed an increase in the degree of colocalization of mitochondria and lysosomes and the expression of the *Parkin* gene. Alisporivir restored these parameters back to levels seen in control cells. Hyperglycemia led to an increase in the expression of the *Drp1* gene in endotheliocytes responsible for the synthesis of proteins involved in the process of fission of mitochondria. Alisporivir did not significantly alter the expression of the gene. The paper discusses the mechanisms of alisporivir effect on mitochondrial dysfunction in murine pulmonary endotheliocytes under conditions of hyperglycemia.

Keywords: mitochondria, alisporivir, mitochondrial permeability transition pore, hyperglycemia, diabetes mellitus, mitophagy

УДК 577.24

АНТИБИОТИК ПИРРОЛОМИЦИН ЯВЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМ РАЗОБЩИТЕЛЕМ МИТОХОНДРИЙ

© 2022 А.М. Фирсов, Л.С. Хайлова, Т.И. Рокицкая,
Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: antonen@belozersky.msu.ru, yuriantonenko@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2022

После доработки 08.06.2022

Принята к публикации 08.06.2022

Пирроломицины С (Pyr_C) и D (Pyr_D) – антибиотики, продуцируемые *Actinosporangium* и *Streptomyces*, механизмом антимикробного действия которых является деполяризация мембраны бактерий и подавление их биоэнергетики через разобщение окислительного фосфорилирования. В основе данного явления лежит протонотворная активность пирроломицинов [Valderrama et al. (2019) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**, e01450-19]. В настоящей работе исследовано действие пирроломицинов на выделенные митохондрии печени крысы. Оказалось, что Pyr_C обладает большей активностью, чем Pyr_D, и разобщает митохондрии в субмикромольном диапазоне концентраций, что проявляется в деполяризации мембраны митохондрий и стимуляции их дыхания. В случае препаратов митохондрий с нарушенной целостностью внешней мембраны различия в действии этих антибиотиков существенно уменьшаются. В случае «вывернутых» субмитохондриальных частиц (СМЧ) более активным разобщителем, напротив, является Pyr_D, при этом СМЧ разобщаются уже при наномольных концентрациях антибиотика. Протонотворное действие Pyr_D на плоской бислойной липидной мембране (БЛМ) имеет максимум при рН около 9, что близко к pK_a этого соединения. Pyr_D работает как типичный анионный протонотвор, активность которого снижается при добавлении дипольного модификатора флоретина. Такое же соотношение протонотворной активности Pyr_D и Pyr_C получено нами на липосомах, нагруженных рН-индикатором пиранином. Высказано предположение о том, что различие между протонотворным действием этих антибиотиков на митохондриях и на БЛМ можно отнести за счёт большей способности Pyr_C проникать через внешнюю мембрану митохондрий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пирроломицин, митохондрии, разобщитель, протонотвор, дыхание, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S032097252207003X, **EDN:** AVMAKK

ВВЕДЕНИЕ

Пирроломицины – антибиотики, продуцируемые актиномицетами и стрептомицетами [1–3]. Как следует из их названия, эти соединения содержат в своей структуре пиррольную группу. Пирроломицины С (Pyr_C) и D (Pyr_D), представляющие собой пиррол,

соединённый через карбонильную группу с бензольным кольцом, различаются только количеством атомов хлора в обоих кольцах: в Pyr_C их четыре, а в Pyr_D – пять [4] (рис. 1). Pyr_C более активен против грамположительных бактерий по сравнению с Pyr_D. В основе антибактериального действия этих соединений лежит их протонотворная активность, которая была показана на искусственных липидных бислоях [5], где оба соединения оказались более активными, чем очень сильный классический разобщитель окислительного фосфорилирования митохондрий, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (КЦХФ), причём Pyr_D на бислойной липидной мембране (БЛМ) был заметно

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; КЦХФ – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон; СМЧ – субмитохондриальные частицы; АСМА – 9-амино-6-хлор-2-метоксиакридин; DNP – 2,4-динитрофенол; Pyr_C – пирроломицин С; Pyr_D – пирроломицин D.

* Адресат для корреспонденции.

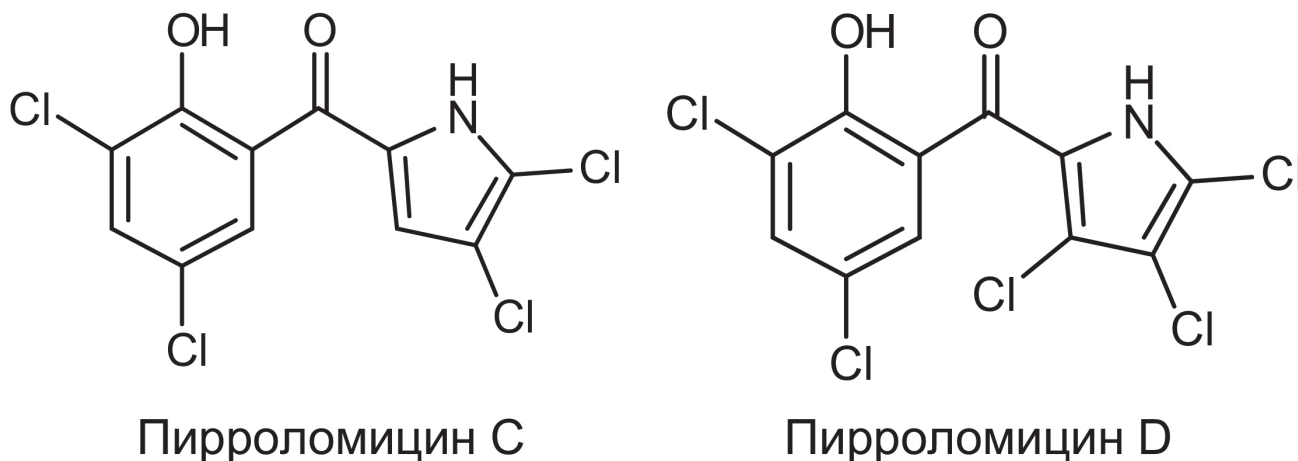


Рис. 1. Химическая структура Prg_C и Prg_D

сильнее, чем Prg_C. Целью настоящей работы было сравнение разобщающего действия Prg_C и Prg_D на препаратах выделенных митохондрий. В ходе подробного исследования действия Prg_C и Prg_D на выделенных митохондриях печени крысы мы показали, что Prg_C вызывает их разобщение в субмикромольном диапазоне концентраций. Причём, как и в случае бактерий, действие Prg_C на митохондрии, а именно: деполяризация мембраны и стимуляция дыхания митохондрий, проявляется при более низких концентрациях по сравнению с Prg_D. Было показано также, что действие пирроломицинов на препаратах митохондрий, частично лишённых внешней мембраны, существенно усиливается, причём усиление более ярко выражено в случае Prg_D. Высказано предположение о том, что эффективность действия пирроломицинов на митохондрии во многом определяется их проницаемостью через внешнюю митохондриальную мембрану.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реагенты фирмы «Sigma-Aldrich» США, если не указано особо. Пирроломицины С (Prg_C) и D (Prg_D) были любезно предоставлены Рубеном Харткоопом из университета Лилля, Франция.

Митохондрии из печени крыс получали, как описано ранее [6]. Полученные митохондрии суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4) и 1 мМ EGTA. Концентрацию белка измеряли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта.

Дыхание митохондрий измеряли при 25 °С полярографическим методом: по уменьшению концентрации кислорода в среде инкубации

при помощи кислородного электрода Кларка («Strathkelvin Instruments», Великобритания) с использованием системного программного обеспечения 782. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4) и 1 мМ EGTA. Концентрация митохондриального белка составляла 0,4 мг/мл.

Митопласты (препараты митохондрий, частично лишённых внешней мембраны) получали в процессе инкубирования митохондрий печени крысы в течение 10 мин в буфере, содержащем 10 мМ MOPS, 1 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) с добавлением 25 мМ KCl. После инкубирования суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, а осадок суспендировали в вышеописанном буфере, содержащем сахарозу.

Мембранный потенциал митохондрий и митопластов измеряли, используя в качестве индикатора сафранин О [7]. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS (pH 7,4), 1 мМ EGTA, 5 мМ сукцинат, 2 мкМ ротенон, олигомицин (2 мкг/мг белка) и 15 мкМ сафранин О. Концентрация белка митохондрий и митопластов составляла 0,6–0,7 мг/мл. Мембранный потенциал измеряли по разности оптического поглощения при длинах волн 555 и 523 нм на спектрофотометре Aminco DW-2000 (Aminco, США) в двуволновом режиме.

Мембранный потенциал субмитохондриальных частиц сердца быка. Субмитохондриальные частицы (СМЧ), выделенные из сердца быка по методу, описанному в работе Grivennikova et al. [8], были любезно предоставлены Гривенниковой В.Г. (кафедра биохимии биологического факультета МГУ). Измерения градиента pH в ответ на добавление NADH регистрировали по изменению флуоресценции 9-амино-6-хлор-2-метоксиакридина (АСМА)

с помощью спектрофлуориметра Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия) при длине волны возбуждения 410 нм и эмиссии – 480 нм, как описано в работе Deleage et al. [9]. Среда инкубации содержала 10 мМ HEPES (pH 7,4), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ и 0,5 мкг/мл АСМА.

Проницаемость плоских бислоевых фосфолипидных мембран для ионов водорода измеряли в тefлоновой ячейке с двумя отсеками, разделёнными тefлоновой перегородкой с отверстием 0,6 мм в диаметре, на котором формировали мембрану из фосфолипида дифита-

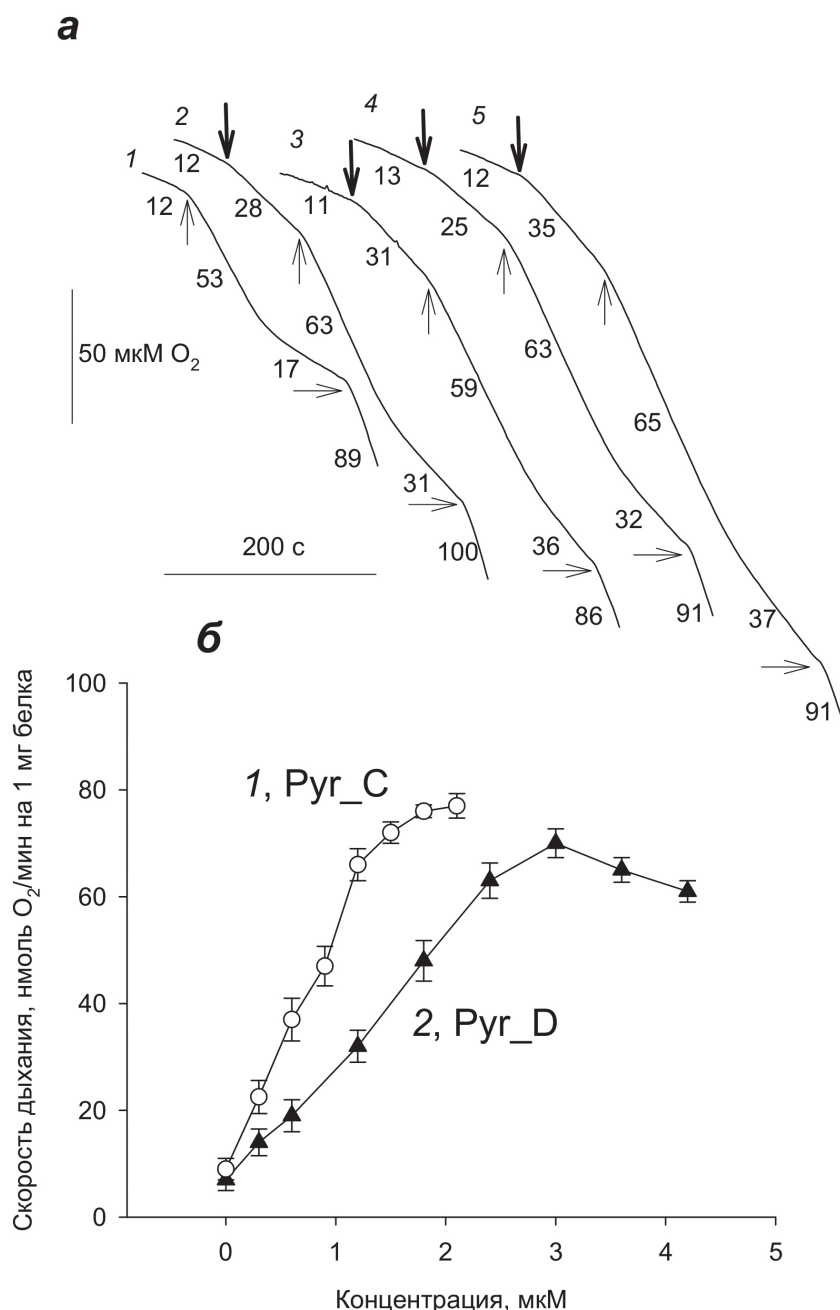


Рис. 2. Действие пирроломицинов С (Pyr_C) и D (Pyr_D) на дыхание выделенных митохондрий. *а* – Действие Pyr_C и Pyr_D (стрелки вниз) на скорость дыхания выделенных митохондрий печени крысы до добавки ADP (стрелки вверх), после добавки 100 мкМ ADP и после истощения ADP в реакционной среде. Субстратом дыхания был сукцинат (5 мМ). Цифрами на кривых даны скорости дыхания в различных состояниях (нмоль O₂/мин на 1 мг митохондриального белка). Концентрация Pyr_C была 1,2 мкМ (кривая 2) и 2 мкМ (кривая 3). Концентрация Pyr_D была 2 мкМ (кривая 4) и 3 мкМ (кривая 5). Кривая 1 – контроль без добавления пирроломицина. В конце каждой записи добавляли 40 мкМ DNP (стрелки вправо) для достижения максимального дыхания. В среде измерения присутствовал БСА (0,5 мг/мл). *б* – Зависимости скорости дыхания митохондрий от концентрации Pyr_C (кривая 1) и Pyr_D (кривая 2) в отсутствие БСА. Подробности см. в разделе «Материалы и методы». Точки данных представляют собой средние значения ± стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов

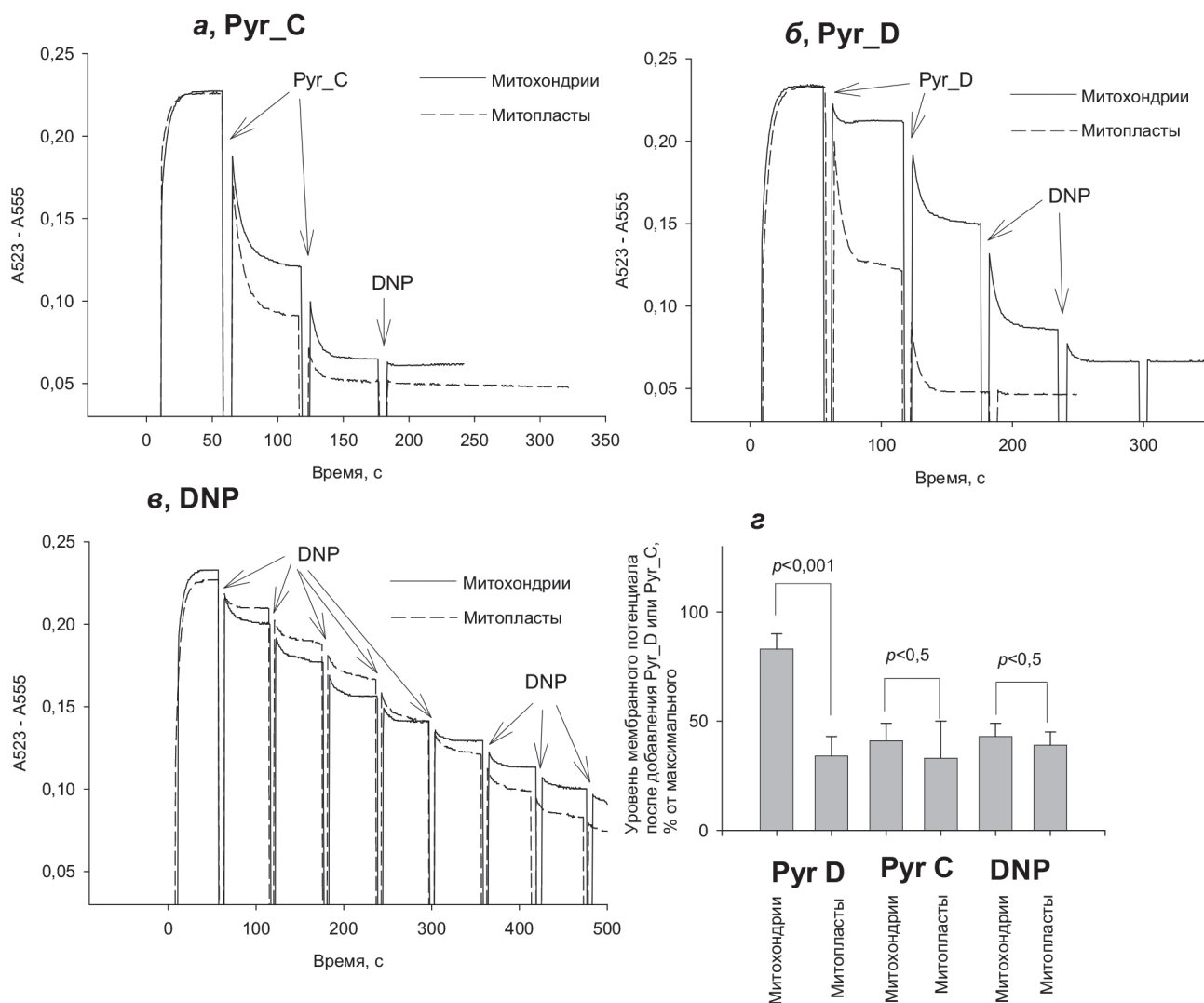


Рис. 3. Действие пирроломидина С (Pyr_C, две добавки по 0,3 мкМ, панель а) и пирроломидина D (Pyr_D, две добавки по 0,3 мкМ, панель б) и DNP (5 добавок по 10 мкМ и 3 добавки по 20 мкМ, панель в) на мембранный потенциал митохондрий (сплошные кривые) и препаратов митохондрий, частично лишённых внешней мембраны (митопласты, пунктирные кривые), измеренный по изменению разности поглощения сафранина О при 555 и 523 нм. Митохондрии энергизовали добавлением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (5 мкМ) и олигомицина. з – Статистическая обработка значений мембранного потенциала митохондрий и митопластов в присутствии 0,3 мкМ Pyr_C и Pyr_D, а также 50 мкМ DNP (% по отношению к сигналу в контроле). Подробности см. в разделе «Материалы и методы». Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов

ноилфосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids», США) в концентрации 20 мг на мл декана. Измерения тока через мембрану осуществляли двумя AgCl-электродами, погружёнными в ячейку по обе стороны мембраны, используя усилитель OES-2 («Opus», Россия).

Проницаемость мембран липосом для ионов водорода измеряли с помощью pH-чувствительного красителя пиранина, как описано в работе Denisov et al. [10] по несколько модифицированной методике [11]. Липосомы готовили из диолеилфосфатидилхолина (DOPC), диолеилфосфатидилглицерина (DOPG) и холестерина в

пропорции 54/13/33. Раствор липидов в хлороформе (10 мг в 1 мл) был тщательно высушен в токе азота, следовые остатки растворителя удалены под вакуумом. Затем липиды были ресуспендированы в буфере, содержащем 100 мМ KCl, 20 мМ MES, 20 мМ MOPS, 20 мМ Tricine (pH 6,0), с добавлением 0,5 мМ пиранина. Концентрация липида в растворе составила 10 мг/мл. Смесь интенсивно встряхивали и замораживали при -20°C . Операцию повторяли три раза. Моноламеллярные липосомы получали методом экструзии через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя миниэкструдер («Avanti Polar Lipids»).

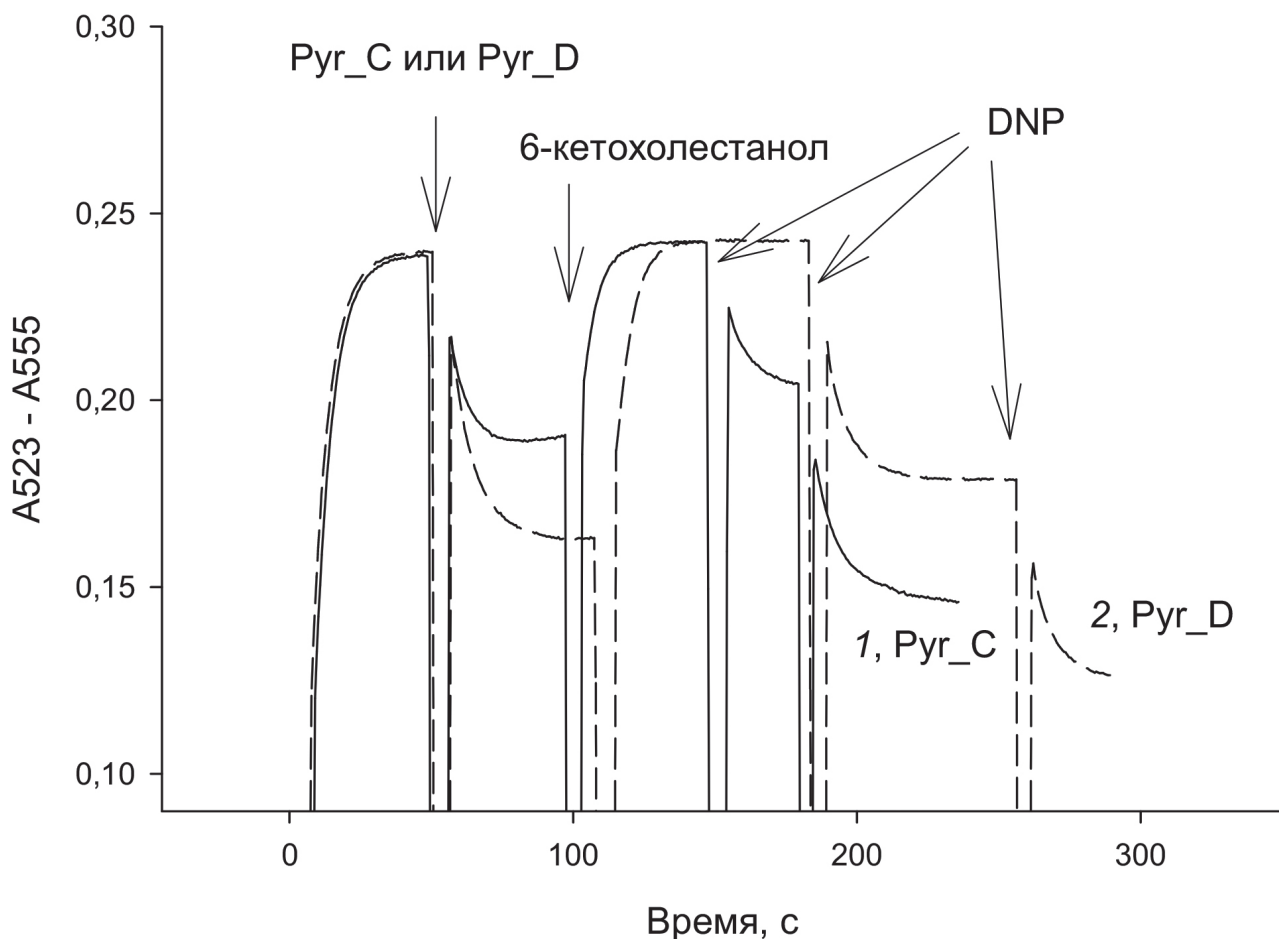


Рис. 4. Ресопрягающее действие 6-кетохолестанола (50 мкМ) при разобщении митохондрий пирроломицином С (Pyrg_C, 100 нМ, кривая 1) и пирроломицином D (Pyrg_D, 0,3 мкМ, кривая 2). Показана запись измерения мембранного потенциала митохондрий по изменению разности поглощения сафранина O при 555 и 523 нм. Митохондрии энергизовали добавлением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (5 мкМ) и олигомицина. В конце опыта вводили две добавки по 100 мкМ DNP. Подробности см. в разделе «Материалы и методы»

Внелипосомальный пиранин отделяли пропуская через колонку с Sephadex G-50, уравновешенную тремя объемами вышеописанного буфера. Измерения проводили на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 в условиях термостатирования (15 °С). Флуоресценцию регистрировали на длине волны 505 нм при длине волны возбуждения 455 нм. В конце каждой записи добавляли K^+/H^+ -обменник, ласалоцид А, для полного рассеивания градиента протонов. Для предотвращения образования протонного диффузионного потенциала эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разобщители окислительного фосфорилирования стимулируют дыхание изолирован-

ных митохондрий и одновременно снижают их мембранный потенциал, поскольку являются протонофорами, а дыхательная цепь митохондрий состоит из протонных помп. Стимуляция дыхания митохондрий под действием разобщителей не сопровождается увеличением скорости синтеза АТФ, то есть в этих условиях происходит рассеивание высвобождающейся при окислении химической энергии в тепло. Ранее было показано, что Pyrg_C и Pyrg_D сбрасывают мембранный потенциал бактерий и стимулируют дыхание митохондрий [5]. В настоящей работе мы сравнили между собой стимулирующее действие Pyrg_C и Pyrg_D на изолированных митохондриях печени крысы, а также измерили их действие на мембранный потенциал.

На рис. 2, а показаны примеры увеличения скорости дыхания митохондрий под действием Pyrg_C (кривые 2 и 3) и Pyrg_D (кривые 4 и 5) с последующим добавлением 100 мкМ ADP. Субстратом дыхания был сукцинат. При добавлении как Pyrg_C, так и Pyrg_D происходит

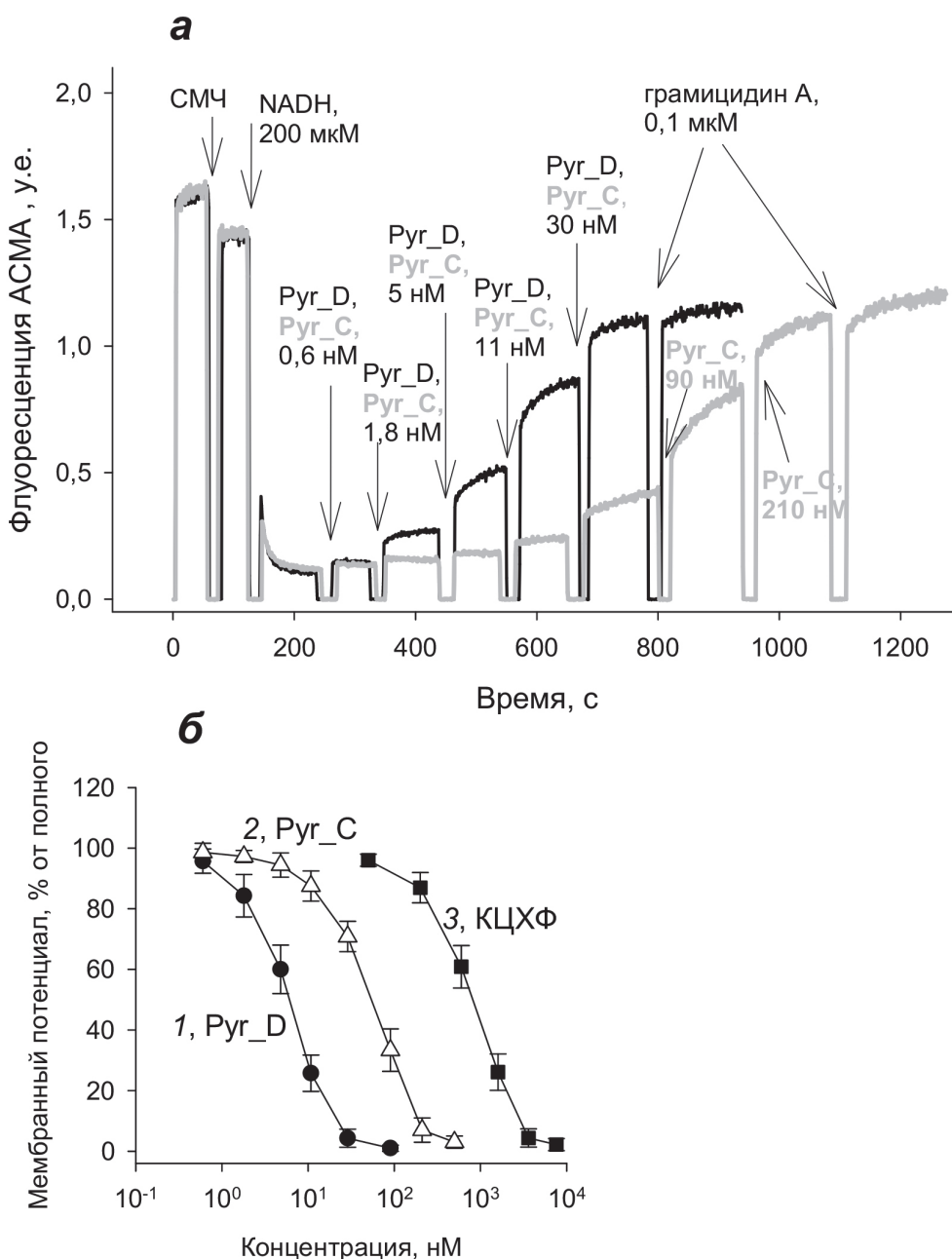


Рис. 5. Действие Pyr_C и Pyr_D на субмитохондриальные частицы. *а* – Действие пирроломитицинов С (Pyr_C, серая кривая) и D (Pyr_D, чёрная кривая) на мембранный потенциал субмитохондриальных частиц (СМЧ), измеренный по флуоресценции АСМА (0,5 мкг/мл, возбуждение – 410 нм, эмиссия – 480 нм). СМЧ энергизовали добавлением NADH (200 мкМ). В конце записей добавляли грамицидин А (0,1 мкг/мл), чтобы полностью сбросить мембранный потенциал СМЧ. *б* – Зависимости мембранного потенциала СМЧ от концентрации Pyr_C (кривая 2), Pyr_D (кривая 1) и КЦХФ (кривая 3). Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов. Среда содержала 100 мМ KCl, 10 мМ HEPES (pH 7,4), 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ EGTA. Концентрация белка – 25 мкг/мл. Подробности см. в разделе «Материалы и методы»

удлинение времени фосфорилирующего дыхания, что выражается в снижении коэффициента ADP/O с 1,95 до 1,48 и далее до 1,32 для 1,2 мкМ и 2 мкМ Pyr_C, и до 1,16 и далее до 0,97 при 2 мкМ и 3 мкМ Pyr_D соответственно. На рис. 2, б приведена зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации Pyr_C (кривая 2) и Pyr_D (кривая 1) в отсутствие до-

бавленного ADP. Обращает на себя внимание то, что действующие концентрации Pyr_C были ниже по сравнению с Pyr_D. В этой серии опытов в среде отсутствовал БСА, который, как было показано ранее [5], снижает действующую концентрацию пирроломитицинов.

На рис. 3 приведены измерения мембранного потенциала митохондрий (сплошные чер-

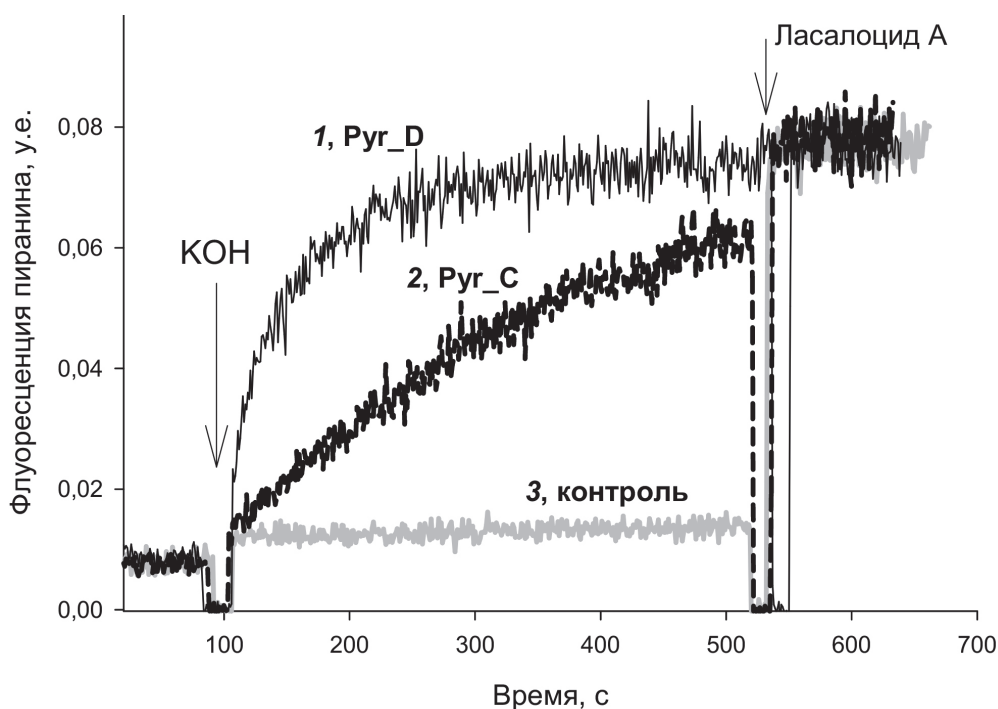


Рис. 6. Индукция протонной проводимости липосом под действием пирроломицинов С (Pyr_C, 0,3 нМ, кривая 1) и D (Pyr_D, 0,3 нМ, кривая 2). Дана зависимость флуоресценции рН-зонда пиранина (возбуждение – 455 нм, регистрация – 505 нм), нагруженного в липосомы, от времени до и после добавления аликвоты КОН, которая сдвигает рН раствора от 6 до 8. В конце каждой пробы добавляли K^+/H^+ -обменник ласалоцид А (1 мкМ) для полного рассеивания градиента рН на мембране

ные кривые) при добавлении одинаковых концентраций Pyr_C (рис 3, а) и Pyr_D (рис 3, б). В соответствии с данными по дыханию митохондрий, показанными на рис. 2, Pyr_C более глубоко снижает мембранный потенциал митохондрий по сравнению с Pyr_D. Пунктирные кривые на рис. 3 показывают аналогичные данные, полученные на препаратах митохондрий, частично лишённых внешней мембраны (митопласты). Видно, что на этих препаратах Pyr_C (а) и Pyr_D (б) сильнее снижают мембранный потенциал по сравнению с митохондриями. На рис. 3, в приведены аналогичные данные для другого разобщителя, DNP, где различия между митохондриями и препаратами, частично лишёнными внешней мембраны, резко уменьшаются. На рис. 3, г приведены величины мембранного потенциала при концентрации Pyr_C и Pyr_D – 0,3 мкМ для митохондрий и препаратов, частично лишённых внешней мембраны. Видно, что в случае Pyr_D различия между митохондриями и митопластами достоверные ($p < 0,001$), тогда как в случае Pyr_C различия статистически не значимы.

Известно, что разобщающее действие на митохондрии для большинства изученных соединений чувствительно к 6-кетохолестанолу или к ингибитору ADP/ATP-антипортера карбоксилатрактилозиду (КАТР) [12, 13]. Например,

эффект классических сильных разобщителей КЦХФ и SF6847 подавляется 6-кетохолестанолом [14], а действие таких разобщителей, как DNP и BAM15, частично снимается карбоксилатрактилозидом [15–17]. Оказалось, что действие как Pyr_C, так и Pyr_D на мембранный потенциал митохондрий почти полностью снимается при добавлении 6-кетохолестанола (рис. 4), тогда как КАТР в обоих случаях практически не оказывает влияния на снижение мембранного потенциала (данные не показаны). Таким образом, Pyr_C и Pyr_D можно отнести к разряду сильных разобщителей, чувствительных к 6-кетохолестанолу.

Обнаруженные нами существенные различия в относительной эффективности Pyr_C и Pyr_D на митохондриях и препаратах, частично лишённых внешней мембраны, указывают на возможную роль внешней мембраны митохондрий как фактора, определяющего эти различия. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперименты на СМЧ, которые представляют собой внутреннюю мембрану митохондрий, но в инвертированной ориентации, так что протонные помпы в этой системе качают протоны внутрь таких замкнутых частиц. На рис. 5, а приведён пример влияния Pyr_C и Pyr_D на мембранный потенциал СМЧ, оценённый с помощью флуоресцентного индикатора АСМА. В этой системе, в отличие от митохондрий,

Руг_D действует существенно активнее, чем Руг_С, снижая мембранный потенциал сильнее при одинаковых концентрациях. В конце опыта добавляли грамицидин А, который полностью сбрасывает мембранный потенциал на СМЧ. Обращает на себя внимание тот факт, что для сброса потенциала в этой системе требуются очень низкие концентрации Руг_D. Так, $[I]_{50}$ для Руг_D составляет около 10 нМ (рис. 5, б), что существенно ниже, чем у КЦХФ (500 нМ) [18]. Насколько мы знаем, такие низкие разобщающие концентрации Руг_D являются рекордными для СМЧ. Более мощное протонифицирующее действие, Руг_D, перекликается с данными, полученными на искусственных БЛМ, где также Руг_D был активнее Руг_С и оба они были намного сильнее КЦХФ [5]. Мы решили проверить этот результат на другой искусственной мембранной системе – липосомах, нагруженных рН-индикатором, пиранином.

Рис. 6 показывает, что добавление 0,3 нМ Руг_D приводит к выравниванию рН на липосомах примерно за 3 мин после сдвига рН с 6 до 8 (кривая 1). Выравнивание рН при добавлении той же концентрации Руг_С происходит медленнее (кривая 2) и требует около 10 мин для завершения процесса. В контрольных опытах без добавления пирроломидина за 10 мин после сдвига внешнего рН внутренний рН изменяется слабо (кривая 3). В этой системе требуется добавлять десятки наномолей КЦХФ, чтобы заметно ускорить кинетику выравнивания рН [19]. Таким образом, ряд протонифицирующей активности изученных разобщителей на липосомах совпадает с рядом протонифицирующей активности на плоских БЛМ [5] и с рядом разобщающей активности на СМЧ (рис. 5).

Важной информацией о механизме работы протонифицирующей активности, измеренная на плоской БЛМ. Для типичного протонифицирующего агента, такого как DNP или КЦХФ, рН-зависимость представляет собой колокол с максимумом при рН в районе pK_a [20]. На рис. 7, а представлена рН-зависимость тока БЛМ, индуцированного Руг_D. Экспериментальная рН-зависимость хорошо аппроксимируется теоретическим уравнением (серая линия), которое ранее было получено для случая переноса протона переносчиком [20–22]:

$$I_{H^+} = A * \frac{1}{2k_n / k_i + 2K[H^+]} \cdot \frac{K[H^+]}{1 + K[H^+]}, \quad (1)$$

где K – константа протонирования протонифицирующей формы, k_i и k_n – кинетические константы транслокации для заряженной и нейтральной формы протонифицирующей формы. В соответствии с пред-

положением о том, что величина k_n больше, чем k_i , максимум рН-зависимости сдвинут вправо от точки $pK_a = 7,8$, которая была определена путём фиттирования экспериментальных данных уравнением (1). Оцененная величина pK_a близка к таковой у 2,4-дихлорфенола с $pK_a = 7,9$. Известно, что ток БЛМ, который индуцируют анионные протонифицирующие агенты (включая КЦХФ), снижается под действием флоретина, тогда как ток катионных протонифицирующих агентов, напротив, растёт при добавлении флоретина [23, 24]. Это происходит потому, что флоретин снижает дипольный потенциал фосфолипидных мембран [23]. На рис. 7, б показано действие флоретина на ток БЛМ, индуцированный Руг_D. Поскольку флоретин снижает ток, можно сделать вывод, что Руг_D является анионным протонифицирующим агентом.

На рис. 7, в показаны записи тока, индуцированного на БЛМ Руг_D при приложении скачка потенциала в 25 мВ при щелочных значениях рН среды инкубации. В этих условиях стационарный ток близок к нулю, однако в начальный момент времени наблюдается существенно больший ток, который спадает в течение десятков миллисекунд. По аналогии с работой по изучению свойств протонифицирующего агента КЦХФ [21] можно предположить, что этот процесс связан с транслокацией анионной формы Руг_D с одной стороны мембраны на другую сторону. Низкая величина стационарного тока говорит тут о том, что процесс связывания Руг_D с поверхностью мембраны довольно медленный, что приводит к истощению связанной формы Руг_D с одной стороны мембраны через некоторое время после приложения напряжения. Кинетики релаксации тока хорошо аппроксимируются моноэкспоненциальными кривыми (серые кривые на рис. 7, в). На вставке к рис. 7, в дана зависимость характерного времени релаксации τ от рН среды. Видно, что с ростом рН время релаксации тока увеличивается. Это означает, что в кинетику транслокации вносит вклад процесс протонирования/депротонирования Руг_D и транспорт протонифицированной формы через мембрану.

Суммируя, можно заключить, что в случае чисто липидных мембран – липосом (рис. 6) или БЛМ [5] – Руг_D действительно является более сильным анионным протонифицирующим агентом по сравнению с Руг_С. Можно предположить, что более эффективное действие Руг_С на митохондриях связано с низкой проницаемостью внешней мембраны митохондрий для Руг_D. Действительно, Руг_D более активен на системе СМЧ, которая представляет собой препарат внутренней мембраны митохондрий. Ранее

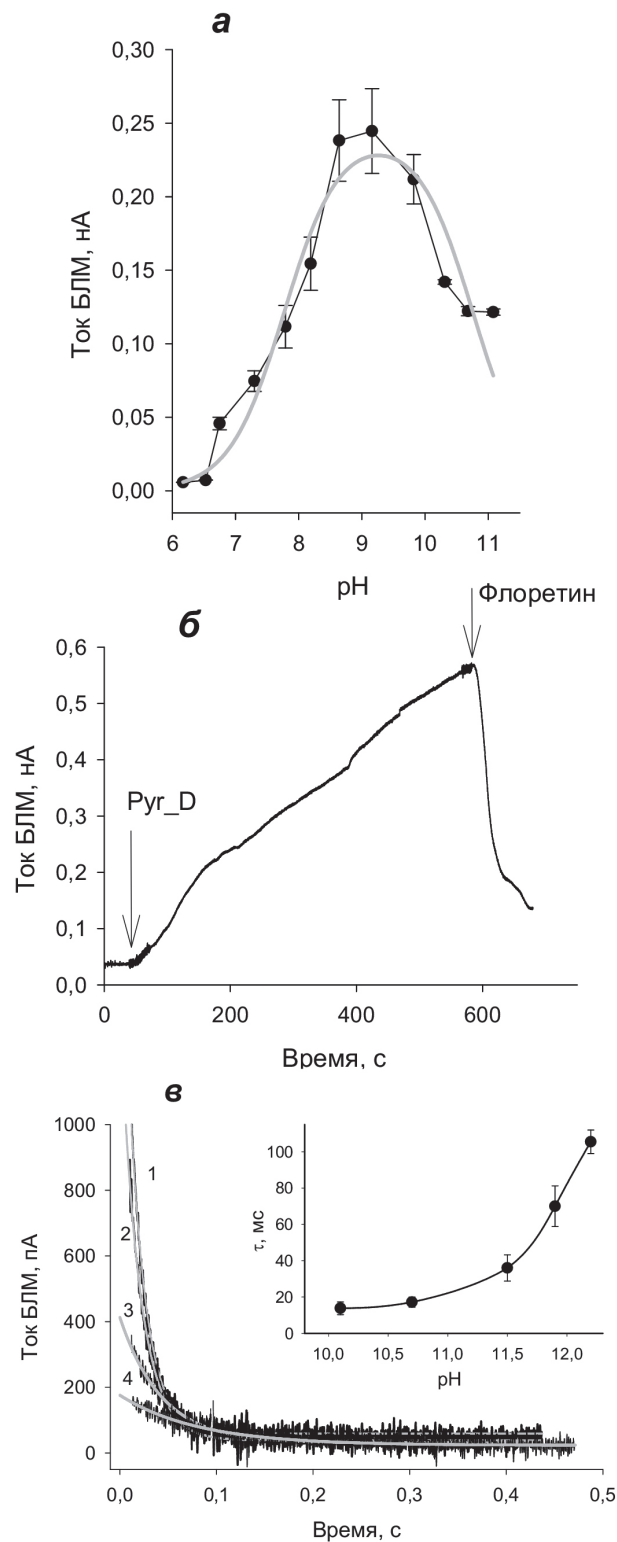


Рис. 7. Действие Pyr_D на плоские БЛМ. *а* – pH-зависимость тока на бислоистой липидной мембране (БЛМ), индуцированного пирроломисицином D (30 нМ). БЛМ была сформирована из деканового раствора дифитаноилфосфатидилхолина. Потенциал на БЛМ был 50 мВ. Среда, омывающая мембрану, содержала 10 мМ Tris, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 10 мМ KCl. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартные отклонения по меньшей мере для трёх независимых экспериментов. Серая кривая является аппроксимацией экспериментальных точек уравнением (1) со следующими параметрами: $pK_a = 7,8$, отношение проницаемости нейтральной и анионной формы – 970. *б* – Действие флоретина (5 мкМ) на ток БЛМ, индуцированный Pyr_D (100 нМ). Опыт ставили в вышеописанных условиях при pH 7,0. *в* – Запись тока БЛМ в присутствии 30 нМ Pyr_D при приложении к мембране +25 мВ в момент времени $t = 0$ с. Серые линии – моноэкспоненциальные кривые с показателем времени 18 мс (кривая 1, pH 10,1), 20 мс (кривая 2, pH 10,7), 43 мс (кривая 3, pH 11,5) и 82 мс (кривая 4, pH 11,9). Вставка: pH-зависимость времени релаксации тока τ . Состав среды: 50 мМ KCl, 5 мМ Na₂B₄O₇.

было показано, что действие пептидного каналоформера грамицидина А на митохондрии также сильно затрудняется наличием у них внешней мембраны [25]. Грамицидин А является очень гидрофобным соединением, и его выход в водную фазу из мембраны практически не происходит. Проницаемость веществ через мембраны сильно зависит от гидрофобности и для гидрофильных соединений растёт с ростом гидрофобности (так называемое правило Овертона), однако при увеличении гидрофобности выше какого-то порога происходит снижение проницаемости [26] из-за «застывания» в мембране. Руг_Д должен быть более гидрофобным по сравнению с Руг_С, поскольку у него на один хлорный заместитель больше. Как известно, введение хлора в скелет молекулы приводит к увеличению коэффициента распределения октанол–вода примерно в 3–5 раз. Сам перенос протонов по челночному механизму работы гидрофобного протонатора может не требовать выхода в водную фазу, как это было показано в случае КЦХФ [27].

Ранее было показано, что один из природных пирроломицинов, диоксипирроломицин, который работает в наномолярном диапазоне концентраций, является сильным разобщителем окислительного фосфорилирования на митохондриях [28]. Следует сказать, что в отличие от Руг_С и Руг_Д, диоксипирроломицин не является фенолом и его протон-транспортные свойства, по всей видимости, определяются протоном при атоме азота в пиррольном фрагменте. Было показано, что введение эпоксиметильной группы в это положение приводит к потере разобщающей активности на изолированных митохондриях, однако полученные производные сохраняют сильное инсектицидное действие, что связывается со способностью неспецифических оксидаз насекомых к ферментативному отщеплению эпоксиметильной группы [29]. В то же время эти соединения оказывают лишь слабое токсическое действие на клетки млекопитающих и растений. Такие свойства позволили широко использовать препарат хлорфенапир (chlorfenapyr) в качестве эффективного инсектицидного средства в сельском хозяйстве.

В заключение обсудим возможность использования пирроломицинов не в качестве антибиотиков или инсектицидов, а в качестве потенциальных препаратов для борьбы с ожирением. Важным преимуществом пирроломицинов является то, что они представляют собой природные соединения. Другой природный разобщитель, усниновая кислота, широко используется как «сжигатель жира», при этом использование синтетического протонатора DNP было запрещено. Для того чтобы подойти к использованию пирроломицинов для борьбы с ожирением необходимо найти те дозы, которые уже стимулируют окислительный метаболизм в организме животных, но ещё не вызывают токсического действия или выраженных побочных эффектов. В качестве первого шага такой работы можно рассматривать опубликованные данные для Руг_С и Руг_Д по цитотоксичности для клеток НЕК-293 [5]. Дальнейшая работа на крысах *in vivo* покажет, насколько пирроломицины подходят для таких целей.

Вклад авторов. Ю.Н. Антоненко — концепция и руководство работой; А.М. Фирсов, Л.С. Хайлова, Т.И. Рокицкая — проведение экспериментов; Т.И. Рокицкая, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко — обсуждение результатов исследования; Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко — написание текста и его редактирование.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00062).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Рубену Харткоопу за предоставление пирроломицинов, И.К. Гореловой (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ) за помощь в проведении экспериментов на БЛМ и В.Г. Гривенниковой (кафедра биохимии биологического факультета МГУ) за предоставление препарата СМЧ.

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. Koyama, M., Kodama, Y., Tsuruoka, T., Ezaki, N., Niwa, T., et al. (1981) Structure and synthesis of pyrrolomycin A, a chlorinated nitro-pyrrole antibiotic, *J. Antibiotics*, **34**, 1569–1576, doi: 10.7164/antibiotics.34.1569.
2. Kaneda, M., Nakamura, S., Ezaki, N., and Litaka, Y. (1981) Structure of pyrrolomycin B, a chlorinated nitro-pyrrole antibiotic, *J. Antibiotics*, **34**, 1366–1368, doi: 10.7164/antibiotics.34.1366.

3. Cascioferro, S., Raimondi, M. V., Cusimano, M. G., Raffa, D., Maggio, B., et al. (2015) Pharmaceutical potential of synthetic and natural pyrrolomycins, *Molecules*, **20**, 21658-21671, doi: 10.3390/molecules201219797.
4. Koyama, M., Ezaki, N., Tsuruoka, T., and Inouye, S. (1983) Structural studies on pyrrolomycins C, D and E, *J. Antibiotics*, **36**, 1483-1489, doi: 10.7164/antibiotics.36.1483.
5. Valderrama, K., Pradel, E., Firsov, A. M., Drobecq, H., Bauderlique-le Roy, H., et al. (2019) Pyrrolomycins are potent natural protonophores, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**, e01450-19, doi: 10.1128/AAC.01450-19.
6. Johnson, D., and Lardy, H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria, *Methods Enzymol.*, **10**, 94-96, doi: 10.1016/0076-6879(67)10018-9.
7. Akerman, K. E., and Wikstrom, M. K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.*, **68**, 191-197, doi: 10.1016/0014-5793(76)80434-6.
8. Grivennikova, V. G., Gladyshev, G. V., and Vinogradov, A. D. (2020) Deactivation of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I): Extrinsic factors, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148207, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148207.
9. Deleage, G., Penin, F., Godinot, C., and Gautheron, D. C. (1983) Correlations between ATP hydrolysis, ATP synthesis, generation and utilization of delta pH in mitochondrial ATPase-ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **725**, 464-471, doi: 10.1016/0005-2728(83)90187-1.
10. Denisov, S. S., Kotova, E. A., Khailova, L. S., Korshunova, G. A., and Antonenko, Y. N. (2014) Tuning the hydrophobicity overcomes unfavorable deprotonation making octylamino-substituted 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (n-octylamino-NBD) a protonophore and uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, *Bioelectrochemistry*, **98**, 30-38, doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.02.002.
11. Chen, Y., Schindler, M., and Simon, S. M. (1999) A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification, *J. Biol. Chem.*, **274**, 18364-18373, doi: 10.1074/jbc.274.26.18364.
12. Skulachev, V. P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 100-124, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00091-1.
13. Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2022) Fifty years of research on protonophores: mitochondrial uncoupling as a basis for therapeutic action, *Acta Naturae*, **14**, 4-13.
14. Starkov, A. A., Dedukhova, V. I., and Skulachev, V. P. (1994) 6-ketocholestanol abolishes the effect of the most potent uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria, *FEBS Lett.*, **355**, 305-308, doi: 10.1016/0014-5793(94)01211-3.
15. Andreyev, A. Y., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., et al. (1988) Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids, *FEBS Lett.*, **226**, 265-269, doi: 10.1016/0014-5793(88)81436-4.
16. Zuna, K., Jovanovic, O., Khailova, L. S., Skulj, S., Brkljako, Z., et al. (2021) Mitochondrial uncoupling proteins (UCP1-UCP3) and adenine nucleotide translocase (ANT1) enhance the protonophoric action of 2,4-dinitrophenol in mitochondria and planar bilayer membranes, *Biomolecules*, **11**, 1178, doi: 10.3390/biom11081178.
17. Firsov, A. M., Popova, L. B., Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Kotova, E. A., et al. (2021) Protonophoric action of BAM15 on planar bilayers, liposomes, mitochondria, bacteria and neurons, *Bioelectrochemistry*, **137**, 107673, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107673.
18. Iaubasarova, I. R., Khailova, L. S., Firsov, A. M., Grivennikova, V. G., Kirsanov, R. S., et al. (2020) The mitochondria-targeted derivative of the classical uncoupler of oxidative phosphorylation carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone is an effective mitochondrial recoupler, *PLoS One*, **15**, e0244499, doi: 10.1371/journal.pone.0244499.
19. Khailova, L. S., Vygodina, T. V., Lomakina, G. Y., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Bicarbonate suppresses mitochondrial membrane depolarization induced by conventional uncouplers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **530**, 29-34, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.131.
20. McLaughlin, S., and Dilger, J. P. (1980) Transport of protons across membranes by weak acids, *Physiol. Rev.*, **60**, 825-863, doi: 10.1152/physrev.1980.60.3.825.
21. O'Shaughnessy, K., and Hladky, S. B. (1983) Transient currents carried by the uncoupler, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 381-387, doi: 10.1016/0005-2728(83)90097-x.
22. Popova, L. B., Nosikova, E. S., Kotova, E. A., Tarasova, E. O., Nazarov, P. A., et al. (2018) Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 1000-1007, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.01.008.
23. Andersen, O. S., Finkelstein, A., Katz, I., and Cass, A. (1976) Effect of phloretin on permeability of thin lipid membranes, *J. Gen. Physiol.*, **67**, 749-771, doi: 10.1085/jgp.67.6.749.
24. Rokitskaya, T. I., Ilyasova, T. M., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (2013) Electro-genic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19: comparison with anionic protonophores, *Eur. Biophys. J.*, **42**, 477-485, doi: 10.1007/s00249-013-0898-9.
25. Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Kovalchuk, S. I., Kotova, E. A., Sorochkina, A. I., et al. (2018) Role of mitochondrial outer membrane in the uncoupling activity of N-terminally glutamate-substituted gramicidin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 281-287, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.06.013.
26. Dickson, C. J., Hornak, V., Pearlstein, R. A., and Duca, J. S. (2017) Structure kinetic relationships of passive membrane permeation from multiscale modeling, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 442-452, doi: 10.1021/jacs.6b11215.
27. Kasianowicz, J., Benz, R., and McLaughlin, S. (1984) The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports pro-

- tons across membranes, *J. Membr. Biol.*, **82**, 179-190, doi: 10.1007/BF01868942.
28. Treacy, M., Miller, T., Black, B., Gard, I., Hunt, D., et al. (1994) Uncoupling activity and pesticidal properties of pyrroles, *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 244-247, doi: 10.1042/bst0220244.
29. Black, B. C., Hollingworth, R. M., Ahammadsahib, K. I., Kukel, D. C., and Donovan, S. (1994) Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50**, 115-128, doi: 10.1006/pest.1994.1064.

THE ANTIBIOTIC PYRROLOMYCIN AS AN EFFECTIVE MITOCHONDRIAL UNCOUPLER

A. M. Firsov, L. S. Khailova, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, and Y. N. Antonenko*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: antonen@belozersky.msu.ru, yuriantonenko@gmail.com*

Pyrrolomycins C (Pyr_C) and D (Pyr_D) are antibiotics produced by *Actinosporangium* and *Streptomyces*. Their antimicrobial action consists in depolarization of the bacterial membrane, leading to suppression of bacterial bioenergetics through uncoupling of oxidative phosphorylation. This phenomenon is based on the protonophoric action of pyrrolomycins [Valderrama et al., *Antimicrob Agents Chemother.* (2019) **63**, e01450]. Here, we studied the effect of pyrrolomycins on isolated rat liver mitochondria. Pyr_C appeared to be more active than Pyr_D and uncoupled mitochondria in the submicromolar concentration range, which manifested itself in depolarization of the mitochondrial membrane and stimulation of mitochondrial respiration. In the case of mitoplasts, i.e., mitochondria with impaired integrity of the outer membrane, the difference in the action of these antibiotics was significantly reduced. In the case of “inverted” submitochondrial particles (SMPs), on the contrary, Pyr_D appeared to be a more active uncoupler, which caused collapse of membrane potential in SMPs at nanomolar concentrations. The protonophoric activity of Pyr_D on a planar bilayer lipid membrane (BLM) had a maximum at pH around 9, i.e., close to the pKa of this compound. Pyr_D behaved as a typical anionic protonophore, with the activity on BLM being decreased by the dipole modifier phloretin. The difference between the protonophoric effects of pyrrolomycins C and D on mitochondria and on lipid membranes were attributed to a higher ability of Pyr_C to penetrate through the outer mitochondrial membrane.

Keywords: pyrrolomycin, mitochondria, uncoupler, protonophore, respiration, membrane potential

УДК 577.15.08

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ПОЧКИ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОДЕТЕКЦИИ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ

© 2022 Ю.М. Шляпников^{1*}, Е.А. Малахова¹, Н.В. Потолдыкова²,
Я.А. Светочева², А.З. Винаров², Д.В. Зинченко³, Е.Ю. Зерний⁴,
А.А. Замятнин мл.^{4,5,6,7}, Е.А. Шляпкинова¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: yuri.shlyapnikov@gmail.com

² Институт урологии и репродуктивного здоровья человека,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия; электронная почта: avinarov@mail.ru

³ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, 117437 Москва, Россия; электронная почта: zdv@bibch.ru

⁴ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: zerni@belozersky.msu.ru

⁵ Институт молекулярной медицины,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия; электронная почта: zamyat@belozersky.msu.ru

⁶ Научно-технологический университет «Сириус»,
354340 Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Россия

⁷ Университет Суррея, факультет здоровья и медицинских наук, Гилфорд, Великобритания

Поступила в редакцию 28.04.2022

После доработки 06.06.2022

Принята к публикации 15.06.2022

Почечно-клеточный рак является наиболее распространенным урологическим злокачественным новообразованием с высокой летальностью и низким уровнем выявляемости. Одним из подходов для улучшения диагностики может быть поиск новых неинвазивных биомаркеров, представленных в жидкой биопсии, и более чувствительных методов их детекции. Известно, что раково-сетчаточные антигены aberrантно экспрессируются в злокачественных опухолях и присутствуют в жидкой биопсии в крайне низких концентрациях. С помощью разработанного нами мультиплексного иммуноанализа с пределом детектирования 0,1 пг/мл мы исследовали мочу и сыворотку 89 больных почечно-клеточным раком и 50 неонкологических пациентов на присутствие раково-сетчаточных антигенов: аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдучина. Для оценки различий между почечно-клеточным раком и контролем использовали критерий χ^2 . Результаты показали высокую диагностическую эффективность комбинации аррестина и рековерина: при пороге 0,1 пг/мл чувствительность составила 96%, специфичность – 92%, AUC = 0,96 (95%-ный доверительный интервал 0,93–0,99). Через 7 дней после нефрэктомии концентрации антигенов вернулись к уровням, характерным для контрольной группы. Таким образом, комбинация аррестина с рековерином может служить диагностическим неинвазивным мочевым биомаркером почечно-клеточного рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: раково-сетчаточные антигены, почечно-клеточный рак, иммуноанализ, магнитные частицы.

DOI: 10.31857/S0320972522070041, EDN: AVPWKD

Принятые сокращения: ДИ – доверительный интервал; ПКР – почечно-клеточный рак; AUC – площадь под ROC-кривой; CAIX – карбоангидраза IX; RKIP – белок-ингибитор Raf-киназы; PLIN2 – перилиптин-2.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Почечно-клеточная карцинома (почечно-клеточный рак, ПКР) является наиболее распространенным урологическим злокачественным новообразованием с высокой смертностью. Существующие методы диагностики, компьютерная (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением и даже ультразвуковое исследование (УЗИ), обладают достаточно высокой диагностической точностью. Тем не менее эти методы не всегда позволяют дифференцировать доброкачественные опухоли почки. Иногда пациенты не готовы получать, пусть и небольшую, лучевую нагрузку при КТ, если при УЗИ возникли подозрения. Кроме того, лучевые методы не всегда позволяют проводить контроль за системной таргетной или иммунотерапией, за радикальностью удаления опухоли или её разрушения при криоабляции и т.д. Поэтому для получения дополнительных диагностических возможностей стали уделять внимание анализу различных биомаркеров.

В настоящее время в качестве диагностических, предиктивных или прогностических биомаркеров ПКР рассматриваются белковые маркеры, специфичные для опухолевой ткани [1–6], сигнатуры экспрессии генов [6–8] и тканевой экспрессии микроРНК [14, 15], мутации генов [9–13] и др. Очевидно, что молекулярные биомаркеры ПКР, представленные в жидкой биопсии, предпочтительнее полученных из опухолевой ткани ввиду неинвазивной процедуры взятия образцов. Удивительно, но анализ сыворотки крови или мочи при диагностике ПКР встречается в литературе гораздо реже, чем при других злокачественных новообразованиях [16]. В частности, крайне мало данных о белках крови, используемых в качестве диагностических и прогностических биомаркеров ПКР [17–19]. Наиболее перспективными кажутся белковые мочевые маркеры, поскольку моча обычно содержит намного меньше общего белка, чем сыворотка, и образцы для анализа легко получить. Кроме того, учитывая, что при ПКР моча находится в непосредственном контакте с опухолью, можно ожидать от таких биомаркеров повышенной эффективности.

На сегодняшний день биомаркеры рака мочевыводящих путей подробно описаны в книге Дакубо [20] и в недавно опубликованных обзорах, например, в работе [21]. Из многочисленных мочевых биомаркеров аквапорин-1 с перилипином-2 (PLIN2), карбоангидраза IX (CAIX), белок, ингибирующий Raf-киназу (RKIP), белок ядерного матрикса-22,

белок 14-3-3 β/α и липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиной, считаются наиболее перспективными в диагностике рака почки. Для детекции мочевых биомаркеров используют различные аналитические методы, и их характеристикам в последнее время уделяют повышенное внимание [21]. В большинстве случаев применяют наборы для ИФА. Однако для повышения чувствительности в ряде случаев используют Вестерн-блоттинг, например, для обнаружения PLIN2 [22, 23]. В дальнейшей работе Hu et al. показали, что PLIN2 в моче может быть более надежно обнаружен с помощью биоплазмонного анализа на бумаге [24]. Для идентификации RKIP была использована масс-спектрометрия [25]. В дополнение к упомянутым маркерам, которые проходят валидацию, с помощью других методов, например, жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в моче были обнаружены белки, также классифицированные как биомаркеры ПКР [26]. К сожалению, несмотря на некоторые достижения, ни один из этих подходов до сих пор не апробирован для применения в клинической практике. Некоторые биомаркеры не прошли валидацию из-за низкой чувствительности или специфичности, несоответствия в дизайне исследования или вариабельности анализа.

Одним из путей решения этих проблем является поиск новых надежных биомаркеров с использованием высокочувствительных технологий [27]. Как было показано ранее, в злокачественных опухолях aberrантно экспрессируется ряд белков, специфичных для иммунопривилегированных зон, таких как фоторецепторные белки (рековерин, аррестин, трансдуцин, родопсинкиназа и др.) [28–31]. Известно, что аутоантитела против рековерина, аррестина, трансдуцина и родопсина иногда обнаруживаются в сыворотках крови пациентов с меланомо-ассоциированным синдромом ретинопатии [30–32]. Однако работ по выявлению раково-сетчаточных антигенов в жидкой биопсии больных ПКР, насколько нам известно, на настоящий момент не опубликовано. Основываясь на идее о том, что использование высокочувствительных технологий может помочь в поиске новых надежных биомаркеров, мы сосредоточились на раково-сетчаточных антигенах, которые ранее не рассматривались в качестве биомаркеров ПКР в моче или сыворотке крови. Целью нашего исследования являлась проверка гипотезы о том, что низкие концентрации раково-сетчаточных антигенов в жидкой биопсии могут являться перспективными диагностическими и предик-

тивными биомаркерами ПКР. В данной работе мы модифицировали метод иммуноанализа на микрочипах с детекцией магнитными частицами, который ранее показал ультравысокую чувствительность при определении широкого спектра аналитов [33–36], и использовали его для обнаружения четырех антигенов, аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдуцина, в моче и сыворотке пациентов с ПКР и людей без онкологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реагенты и мембрана из регенерированной целлюлозы (толщина 40 мкм) приобретены в «Sigma-Aldrich» (США). Карбоксилированные магнитные частицы (1 мкм, Dynabeads MyOne) приобретены в «Invitrogen» (США). Получение рекомбинантных антигенов и антител описано в Приложении.

Пациенты и образцы. Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., пересмотренной в 2008 г., и одобрены Этическим комитетом Сеченовского университета (№10-18; 17/11/2018). Предварительно от всех пациентов было получено письменное согласие на участие в исследовании. Сбор образцов мочи проводился в Институте

урологии и репродуктивного здоровья Сеченовского университета в 2019–2021 гг. Диагноз ПКР был подтвержден гистологическим исследованием образцов ткани, полученных в ходе оперативного лечения. Характеристики пациентов представлены в табл. 1. У пациентов с рТ3-рТ4 выполняли регионарную лимфаденэктомию и оценивали наличие поражения лимфатических узлов. Образцы мочи, сыворотки и опухолевой ткани хранили при –80 °С.

Проведение иммуноанализа. Процедура изготовления белковых микрочипов описана в Приложении. Микрочипы помещали в пробирки с образцом (1–1,5 мл) и инкубировали в течение ночи при 4 °С при вращении со скоростью 20 об./мин. Микрочип промывали водой и фиксировали в проточной ячейке, описанной ранее [27], под которую устанавливали магнит. Суспензию магнитных частиц, конъюгированных с антителами к аррестину, рековерину, трансдуцину и родопсинкиназе, с общей концентрацией $5 \times 10^{-4}\%$ прокачивали через ячейку в течение 2–3 мин со скоростью 10 мкл/мин. Изображения микрочипа получали с помощью оптического микроскопа с темнопольным осветителем.

Статистическая обработка результатов. Изображения микрочипов обрабатывали, как описано в [19, 20] и в Приложении.

Таблица 1. Характеристики пациентов, участвовавших в исследовании

Характеристики		ПКР	Контроль
Общее число пациентов		89	50
Средний возраст (диапазон), годы		59 (31–88)	66 (42–82)
Пол	мужской	52	31
	женский	37	19
Тип опухоли	светлоклеточный рак	68	н/п
	хромофобный рак	6	
	папиллярный рак (тип 1 + тип 2)	14	
	дефицит сукцинат-дегидрогеназы	1	
Стадия опухоли	T1a	53	н/п
	T1b	22	
	T2	3	
	T3	10	
	T4	1	

Примечание. В контрольной группе 25 пациентов имели диагноз мочекаменная болезнь, 18 – доброкачественная гиперплазия предстательной железы, 3 – стриктура уретры, 3 – гидронефроз и 1 – кисты почки. н/п – не применимо.

Пустое пространство вокруг пятен использо- вали для расчета фона. Типичные фоновые значения варьировались в диапазоне 0–500 и 0–1000 частиц/мм² для мочи и сыворотки со- ответственно. Поскольку площадь пятна со- ставляла $(2,0 \pm 0,5) \times 10^4$ мкм², эти значения соответствуют 0–10 и 0–20 частиц на пятно. Для построения калибровки (рис. 1) использо- вали пределы погрешности $2 \times$ (стандартное отклонение сигнала). Анализ считали положи- тельным, если значение сигнала превышало (среднее значение фона) + $2,5 \times$ (стандартное отклонение фона). Для оценки различий между ПКР и контрольной группой использовали тест χ^2 . Для расчета доверительных интервалов (ДИ) значений площади под кривой (AUC) использовали бинормальную модель [37]. Для концентраций раково-сетчаточных антигенов в моче рассчитывали коэффициенты корреля- ции Спирмена. Статистическая обработка данных проводилась в программном пакете Origin Pro 2018.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика пациентов, включенных в исследование. Количество участвующих паци- ентов было выбрано как минимум таким же,

как обычно принято в подобных исследовани- ях [23, 25]. В общей сложности были обследо- ваны и включены в исследование 89 пациентов с ПКР (табл. 1): 68 пациентов со светлоклеточ- ным раком, 6 – с хромофобным, 14 – с папил- лярным (типы 1/2) и 1 – с дефицитом СДГ, а также 50 контрольных пациентов с мочекамен- ной болезнью, доброкачественной гиперплази- ей предстательной железы, простыми кистами почек, стриктурой уретры и гидронефрозом.

Мультиплексный ультрачувствительный им- муноанализ на раково-сетчаточные антигены. Из списка известных раково-сетчаточных антиге- нов [6] были выбраны четыре: аррестин, реко- верин, трансдуцин и родопсинкиназа. Для раз- работки «сэндвич»-иммуноанализа отбирали пары антител. Подробности приведены в При- ложении. Микрочипы изготавливали путём электрораспыления связывающих антител на мембрану из регенерированной целлюлозы по схеме, представленной на рис. 1, а. Ультравы- сокую чувствительность анализа обеспечивает детекция связанных на поверхности микрочи- па аналитов магнитными частицами, которые хорошо видны в микроскопе с темнопольным осветителем (рис. 1, б). Микрочипы обеспечи- вают безопасное применение в потенциально опасных биологических образцах, при этом используемое оборудование не контактирует

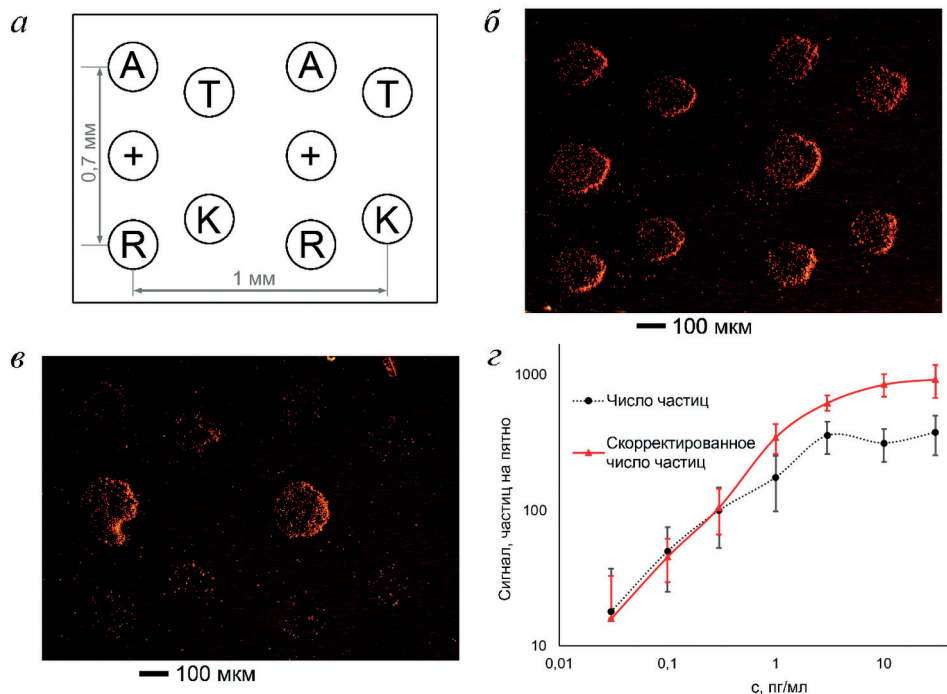


Рис. 1. а – Дизайн микрочипа, используемого в иммуноанализе. А, R, К и Т обозначают пятна антител, специфичных к аррестину, рековерину, родопсинкиназе и трансдуцину соответственно; знак + означает положительный контроль – пятно рекомбинантного рековерина; б, в – изображения микрочипов, полученные при одновременном иммуноанализе 0,1 нг/мл (б) и 0,1 пг/мл (в) каждого из четырех аналитов; г – калибровочные кривые, общие для всех аналитов, основанные на методе расчета сигнала по количеству частиц в пятне (пунктирная черная кривая) и по усовершенствованной методике (сплошная красная кривая)

с образцом. Значение предела детектирования 0,1 пг/мл было достигнуто для всех четырёх аналитов (рис. 1, *в*). Чтобы уменьшить большие вариации сигнала (рис. 1, *з*), была введена коррекция, описанная в Приложении, которая позволила также увеличить динамический диапазон на два порядка (рис. 1, *з* и рис. Д1 в Приложении). Общая калибровочная кривая для всех аналитов показана на рис. 1, *з* (черная кривая), а статистически неразличимые кривые для отдельных антигенов приведены на рис. Д2 в Приложении. Таким образом, мы разработали способ, который может оценивать концентрации четырех антигенов в диапазоне 0,1–10 пг/мл с точностью полпорядка.

Обнаружение раково-сетчаточных антигенов в моче и сыворотке больных ПКР и контрольной группы. Мы сравнили содержание раково-сетчаточных антигенов в образцах сыворотки и мочи больных ПКР, собранных до нефрэктомии, с контрольной группой. После анализа сыворотки крови от 25 пациентов с ПКР и 15 контрольных пациентов стало ясно, что ни один из использованных биомаркеров не обладает предсказательной силой. Соответствующие кривые ROC, представленные на рис. Д3 в Приложении, дают значение AUC $0,5 \pm 0,1$. Вследствие чего анализы сыворотки крови больных больше не проводились.

Мочевые биомаркеры оказались более эффективными, и для них было собрано больше данных. Для оценки предварительных значе-

ний их эффективности использовали образцы мочи 59 больных ПКР и 50 контрольных пациентов. Репрезентативные примеры изображений микрочипов представлены на рис. 2. Расчетные значения AUC для родопсинкиназы и трансдуцина составили 0,65 (95% ДИ 0,55–0,76) и 0,64 (95% ДИ 0,54–0,75) соответственно (рис. 3, *а*). Учитывая то, что аррестин и рековерин показали более высокую эффективность, в их случае было дополнительно проанализировано 30 образцов мочи пациентов с ПКР, так что общее количество образцов составило 89. Окончательные оценки AUC для аррестина и рековерина составили 0,93 (95% ДИ 0,89–0,97) и 0,82 (95% ДИ 0,75–0,89). Гистограммы, показывающие распределение содержания антигенов в образцах мочи при ПКР и контролях, представлены на рис. 3, *б*. Общие результаты анализа образцов мочи и сыворотки, по которым были оценены значения AUC, приведены в табл. Д1 (пациенты с ПКР) и Д2 (контрольная группа) в Приложении. Недостаточное количество точек на кривых ROC на рис. 3, *а* и рис. Д3 в Приложении связано с полуколичественным характером нашего анализа, при котором доступны только пять пороговых значений: 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл, как обсуждалось выше. При пороге 0,1 пг/мл аррестин показал чувствительность 89% и специфичность 94%, а рековерин – чувствительность 66% и специфичность 96%. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании комбинации аррестина с

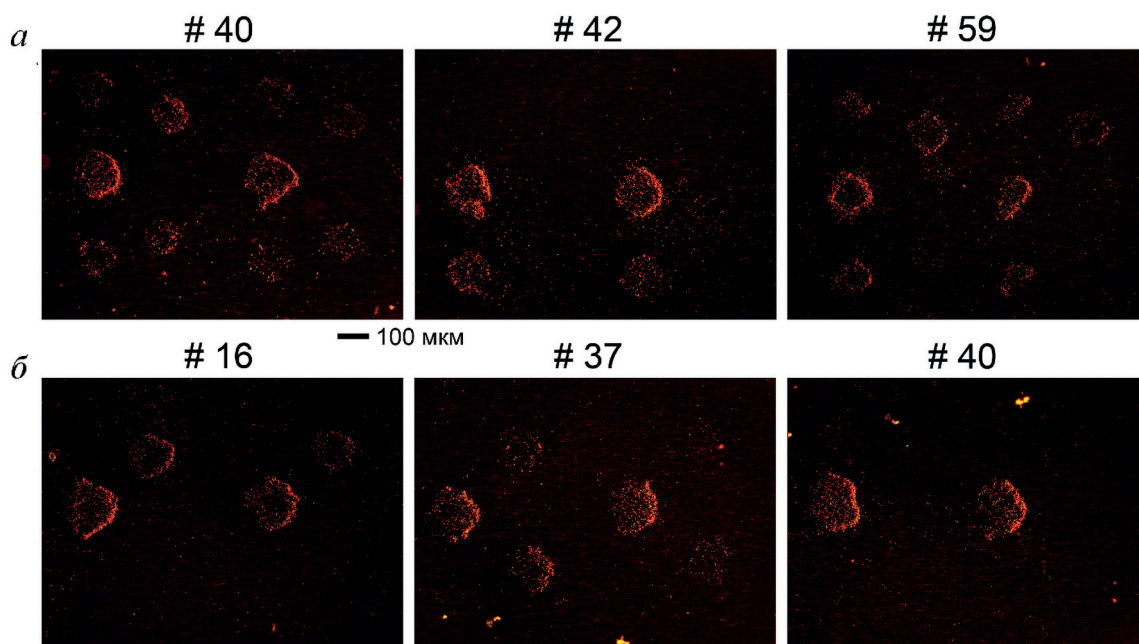


Рис. 2. Репрезентативные примеры результатов иммуноанализа мочи пациентов с ПКР (*а*) и контрольной группы (*б*). Номера соответствуют обозначениям в табл. Д1 (*а*) и Д2 (*б*) в Приложении. Масштабная линейка является общей для всех изображений

рековерином, когда тест считался положительным, если концентрация любого из этих биомаркеров превышала 0,1 пг/мл. В этом случае соответствующее значение AUC составило 0,96 (95% ДИ 0,93–0,99), при этом значения чувствительности и специфичности достигли 96% и 92% соответственно, что является одним из

лучших показателей среди всех опубликованных биомаркеров ПКР в сыворотке и моче. Можно также отметить значительные положительные попарные корреляции между концентрациями различных антигенов в моче пациентов с ПКР (табл. Д3 в Приложении). Если предположить, что концентрация этих биомар-

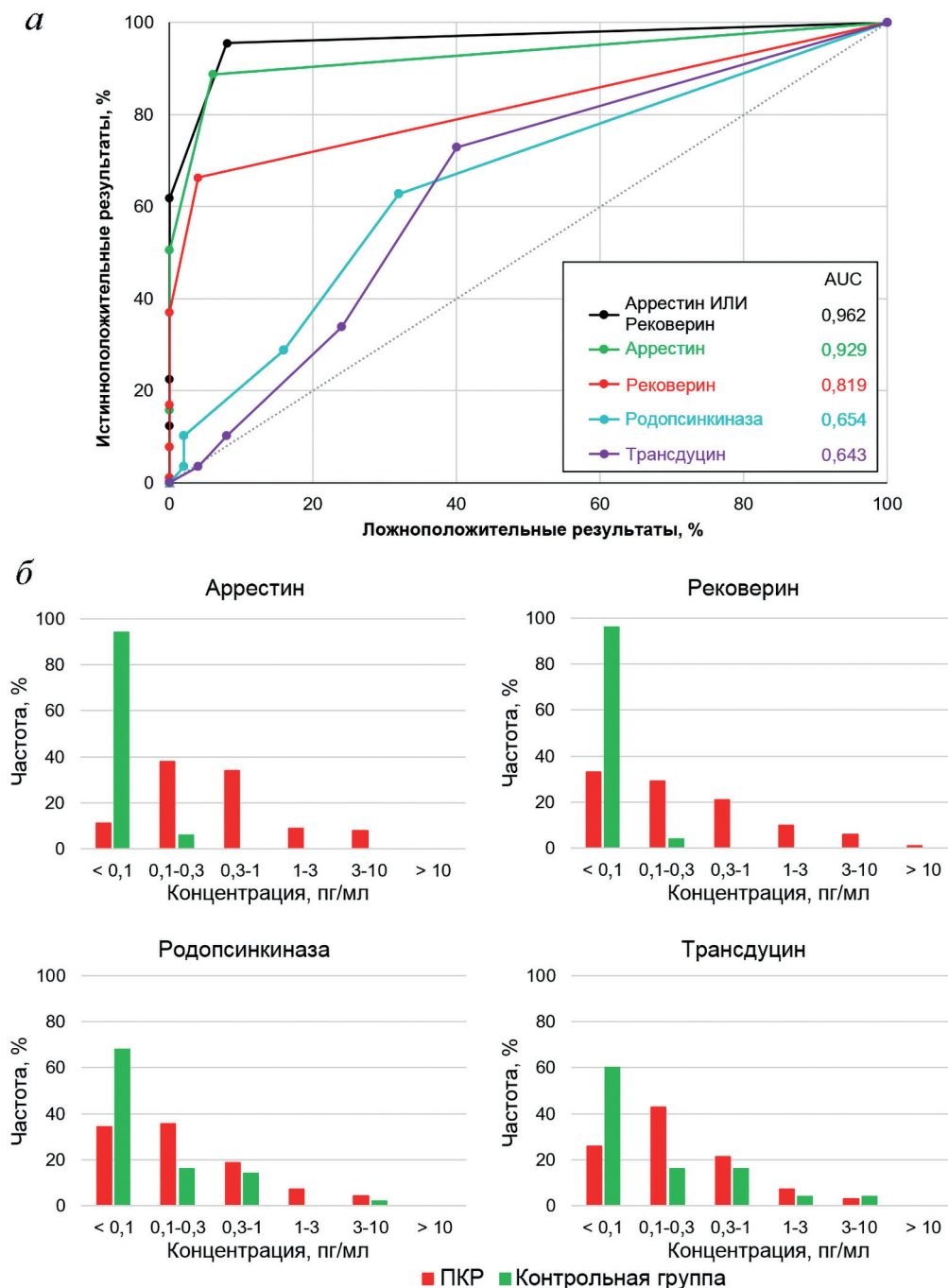


Рис. 3. *а* – ROC-кривые для обнаружения в моче четырех отдельных антигенов (цветные линии) и комбинации аррестина и рековерина (черная линия); *б* – распределение концентраций антигенов в моче пациентов с ПКР (красный) и контрольной группы (зеленый). Размер выборки составил 50 человек из контрольной группы, 59 (для родопсинкиназы и трансдуцина) и 89 (для аррестина и рековерина) пациентов с ПКР. Значения χ^2 -критерия для различий между ПКР и контрольными группами были $< 10^{-10}$ для аррестина и его комбинации с рековерином; 10^{-9} – для рековерина; 0,02 – для родопсинкиназы и 0,01 – для трансдуцина

керов в моче определяется их аберрантной экспрессией в опухолевой ткани, то этот результат закономерен, так как уровни экспрессии в группе близкородственных генов могут иметь положительную корреляцию.

Уровень раково-сетчаточных антигенов после хирургического лечения ПКР. Если раково-сетчаточные антигены, обнаруженные в моче, имеют опухолевое происхождение, то после удаления опухоли они должны исчезнуть. В группе ПКР мы отобрали 10 пациентов, у которых были обнаружены антигены, и проанализировали образцы мочи, собранные через 7 дней после нефрэктомии. Результаты анализа представлены в табл. 2. Во всех случаях содержание аррестина и рековерина в моче было ниже предела детектирования. Родопсинкиназа и трансдуцин были обнаружены в одном и двух образцах соответственно, что согласуется с их относительно низкими значениями специфичности. Эти данные подтверждают, что данные антигены имеют опухолевое происхождение и при удалении опухоли исчезают вместе с ней.

Содержание раково-сетчаточных антигенов в моче больных с различными стадиями и формами ПКР. Наконец, мы исследовали, влияет ли на содержание аррестина и рековерина в моче конкретная форма и стадия опухоли. Мы не нашли существенных различий между группами светлоклеточного, хромофобного и папиллярного ПКР (рис. Д4, А в Приложении), что позволяет предположить, что аберрантная экспрессия раково-сетчаточных антигенов

является общей чертой различных опухолей. Стадия опухоли также не влияет на концентрации данных антигенов в моче, как показано на рис. Д4, Б в Приложении. Вполне вероятно, что не размер опухоли, а другие её характеристики, такие как способность эффективно промываться мочой, определяют высвобождение антигенов в мочу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Очевидно, что открытие новых молекулярных маркеров для раннего выявления и прогнозирования ПКР по-прежнему остается сложной задачей для исследователей. В данной работе мы отмечаем полезность жидкой биопсии для обнаружения продуктов опухолевых клеток, а именно раково-сетчаточных антигенов. Наши данные свидетельствуют о том, что некоторые из них практически всегда экспрессируются при злокачественных опухолях почки. В то же время имеющиеся в литературе данные об экспрессии этих биомаркеров в других тканях злокачественных опухолей демонстрируют более низкую частоту встречаемости. При меланоме все раково-сетчаточные антигены выявлялись в ткани не более чем в 80% случаев как на белковом уровне (Вестерн-блоттинг), так и с помощью мРНК (RT-PCR) [31]. Экспрессия рековерина наблюдалась в 10–40% случаев рака легкого, желудка и толстой кишки [38, 39]. Экспрессия

Таблица 2. Концентрация антигенов в моче до удаления опухоли и через семь дней после

Пациент №	Аррестин		Рековерин		Родопсинкиназа		Трансдуцин	
	До	После	До	После	До	После	До	После
2	0,1–0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1
6	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1
9	3–10	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,3–1	< 0,1
12	3–10	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1
15	0,3–1	< 0,1	> 10	< 0,1	1–3	< 0,1	3–10	< 0,1
29	1–3	< 0,1	1–3	< 0,1	1–3	0,1–0,3	0,3–1	< 0,1
40	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,3–1	0,3–1
41	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	1–3	< 0,1
52	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1–0,3	0,3–1
72	1–3	< 0,1	1–3	< 0,1	–	–	–	–

Примечание. Пациенты пронумерованы в соответствии с табл. 1 в Приложении.

аррестина и рековерина в опухолевых тканях больных ПКР составила 59% и 68% случаев соответственно [19, 28]. При этом аутоантитела к аррестину были обнаружены в сыворотке крови у 76% больных ПКР [19]. Это означает, что частота появления аутоантител к аррестину выше, чем самого аррестина, то есть аррестин экспрессируется в количествах, недостаточных для детекции с помощью иммуногистохимии, но достаточно больших, чтобы вызвать иммунный ответ. Таким же образом можно объяснить и наши результаты. Даже если уровни экспрессии биомаркеров крошечные, они вымываются из опухоли в мочу, а ультрачувствительный анализ позволяет их обнаружить, несмотря на то что в миллилитре содержится около миллиона молекул. Кроме того, мочевые биомаркеры определяются надежнее по сравнению с сывороткой, поскольку белки, попадающие в кровоток, более разбавлены и могут метаболизироваться быстрее.

В настоящее время аквапорин-1 и перилипидин-2 отмечены как наиболее перспективные биомаркеры ПКР с чувствительностью и специфичностью 95% и 91% соответственно; в комбинации они показали 100% чувствительность и 95% специфичность [23]. Точно так же комбинация RKIP с его фосфорилированной формой продемонстрировала наибольшую диагностическую и прогностическую ценность при выявлении ПКР [25]. Závada et al. [40] сообщили, что САИХ в моче является биомаркером обнаружения ПКР с чувствительностью 70% и специфичностью 100% по сравнению с пациентами с доброкачественными урологическими опухолями. Однако, поскольку концентрации САИХ оказались слишком низкими у пациентов с ПКР, были введены предварительное концентрирование мочи и более сложный метод Вестерн-блоттинга, что снизило потенциал широкого использования этого биомаркера. Уникальная высокая специфичность САИХ может быть использована для улучшения перспектив его скрининга путем объединения его с другими потенциальными биомаркерами, демонстрирующими высокую чувствительность и низкую специфичность, в частности, при их детекции более чувствительными методами мультиплексного анализа. В целом, идея о том, что использование биомаркеров с разными характеристиками чувствительности и специфичности в одном анализе может улучшить диагностику рака, представляется весьма привлекательной и обоснованной [21]. Мы показали, что использование многокомпонентного микрочипа для одновременного определения аррестина и рековерина приводит к чрезвы-

чайно высоким значениям чувствительности и специфичности. При этом после хирургического удаления злокачественной опухоли уровень этих антигенов в моче снижается до нуля. Таким образом, можно ожидать, что эти биомаркеры будут очень эффективны при последующем наблюдении пациентов после нефрэктомии или других инвазивных процедур.

Следует обсудить проблему точности нашего анализа. Точность измерения концентрации составляла примерно половину десятичного порядка, что делает наш анализ полуколичественным. По этой причине мы не нормировали концентрацию мочевых биомаркеров по креатинину [22, 25]. Можно заключить, что применение нашего теста для качественного анализа представляется наиболее перспективным.

Наконец, для любого высокочувствительного теста, используемого для анализа образцов с большим избытком других белков, естественно возникает проблема специфичности. Несмотря на то что наш метод в целом демонстрирует хорошую специфичность [41], существуют некоторые проблемы. В частности, высокое содержание аррестина в контрольных образцах сыворотки крови, вероятно, обусловлено неспецифическими взаимодействиями, хотя нам и не удалось получить прямых доказательств. Проблемы со специфичностью могут возникать и по чисто физиологическим причинам. Показано, что данные антигены экспрессируются в тканях и без злокачественных новообразований, как в случае онкоцитомы [19, 20]. Антигены могут быть неспецифичны для ПКР, поскольку опухоли в других тканях, таких как мочевой пузырь или предстательная железа, также контактируют с мочой и могут высвобождать эти мочевые биомаркеры. Это является общей проблемой для широкого круга различных биомаркеров [21]. Поэтому необходимы исследования по определению уровня аррестина и рековерина в моче у больных с доброкачественными урологическими опухолями, а также с другими видами злокачественных новообразований. Мы полагаем, что предложенный метод, обладая высокой чувствительностью, имеет высокий диагностический и предиктивный потенциал: даже если при дальнейших исследованиях возникнут проблемы со специфичностью, наличие положительного результата теста даст первый сигнал для углубленного медицинского обследования. Многообещающей перспективой настоящей работы является также применение ультрачувствительного иммуноанализа для обнаружения других биомаркеров, имеющих более высокую специфичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью ультрачувствительного иммуноанализа мы выявили новые мочевые биомаркеры для неинвазивной диагностики ПКР. Для комбинации раково-сетчаточных антигенов аррестина и рековерина значение АУС достигает 0,965. При пороге 0,1 пг/мл чувствительность составляет 96%, а специфичность – 92%, что является одним из самых высоких показателей среди опубликованных биомаркеров ПКР. Высокая диагностическая эффективность обеспечивается аналитической методикой на основе белкового микрочипа с детекцией сигнала магнитными частицами без использования дорогостоящего оборудования. Дополнительным преимуществом является чрезвычайно низкий расход антител, который в одном анализе не превышает 3 нг по сравнению с ~100 нг в ИФА.

Новый метод может быть использован не только в первичной, но и в уточняющей диагностике ПКР, в частности, для определения оптимальной терапии. Новые опухолеспецифические белки имеют значительный потенциал не только в качестве диагностических, но и предиктивных биомаркеров ПКР. Полученные нами результаты по послеоперационной динамике аррестина и рековерина в моче дают возможность их использования для оценки эффективности оперативного вмешательства или других видов терапии, а также для доклинического выявления рецидивов заболевания. Очевидно, однако, что для определения оптимальной «философии» применения предложенного метода в клинической практике потребуются дополнительные исследования.

В настоящей работе применение нового метода иммуноанализа продемонстрировано на модели ПКР. Вместе с тем мы считаем, что полученные результаты могут быть также использованы в диагностике и терапии других онкозаболеваний, в первую очередь урологических: рака мочевого пузыря и простаты, при которых aberrantly экспрессируемые белки также могут экстрагироваться из опухоли в мочу. Это представляется перспективной темой для будущих исследований.

Вклад авторов. Ю.М. Шляпников, А.З. Винаров, А.А. Замятнин – концепция и руководство работой; Ю.М. Шляпников, Е.А. Малахова, Е.А. Шляпникова – проведение экспериментов; Н.В. Потолдыкова и Я.А. Светочева – сбор и обработка образцов; Д.В. Зинченко и Е.Ю. Зерний – получение антител и антигенов; Ю.М. Шляпников, А.З. Винаров, А.А. Замятнин – обсуждение результатов исследования; Е.А. Шляпникова и Ю.М. Шляпников – написание текста; Ю.М. Шляпников, А.А. Замятнин – редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы с участием людей были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halabi, S., Yang, Q., Carmack, A., Zhang, S., Foo, W. C., et al. (2021) Tissue based biomarkers in non-clear cell RCC: correlative analysis from the ASPEN clinical trial, *Kidney Cancer J.*, **19**, 64-72, doi: 10.52733/kcj19n3-a1.
- Li, F., Aljahdali, I. A. M., Zhang, R., Nastiuk, K. L., Krolewski, J. J., et al. (2021) Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1alpha, HIF2alpha, NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **40**, 254, doi: 10.1186/s13046-021-02026-1.
- Kobayashi, G., Sentani, K., Babasaki, T., Sekino, Y., Shigematsu, Y., et al. (2020) Claspin overexpression is associated with high-grade histology and poor prognosis in renal cell carcinoma, *Cancer Sci.*, **111**, 1020-1027, doi: 10.1111/cas.14299.
- Signoretti, S., Flaifel, A., Chen, Y., and Reuter, V. E. (2018) Renal cell carcinoma in the era of precision medicine: from molecular pathology to tissue-based biomarker, *J. Clin. Oncol.*, **36**, 3553-3559, doi: 10.1200/JCO.2018.79.2259.
- Kim, S., Park, W., Park, E., Park, B., Joo, J., et al. (2017) The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry, *PLOS One*, **12**, e0179610, doi: 10.1371/journal.pone.0179610.
- Graham, J., Heng, D. Y. C., Brugarolas, J., and Vaishampayan, U. (2018) Personalized management of advanced kidney cancer, *Am. Soc. Clin. Oncol.*, **38**, 330-341, doi: 10.1200/EDBK_201215.

7. Gulati, S., and Vogelzang, N. J. (2021) Biomarkers in renal cell carcinoma: Are we there yet? *Asian J. Urol.*, **8**, 362-375, doi: 10.1016/j.ajur.2021.05.013.
8. Lin, J., Yu, M., Xu, X., Wang, Y., Xing, H., et al. (2020) Identification of biomarkers related to CD8⁺ T cell infiltration with gene co-expression network in clear cell renal cell carcinoma, *Aging*, **12**, 3694-3712, doi: 10.18632/aging.102841.
9. Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., et al. (2019) The metabolic basis of kidney cancer, *Cancer Discov.*, **9**, 1006-1021, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1354.
10. Junker, K., and Zeuschner, P. (2019) Personalised medicine in renal cell tumours, *Aktuelle Urol.*, **50**, 513-523, doi: 10.1055/a-0895-9201.
11. Light, A., Ahmed, A., Dasgupta, P., and Elhage, O. (2020) The genetic landscapes of urological cancers and their clinical implications in the era of high-throughput genome analysis, *BJU Int.*, **126**, 26-54, doi: 10.1111/bju.15084.
12. Jonasch, E., Walker, C. L., and Rathmell, W. K. (2021) Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality, *Nat. Rev. Nephrol.*, **17**, 245-261, doi: 10.1038/s41581-020-00359-2.
13. Shan, L., Zhu, X. L., Zhang, Y., Gu, G. J., Cheng, X. (2021) Expression and clinical significance of NUF2 in kidney renal clear cell carcinoma, *Transl. Androl. Urol.*, **10**, 3628-3637, doi: 10.21037/tau-21-620.
14. Mytsyk, Y., Borys, Y., Tumanovska, L., Story, D., Kucher, A., et al. (2019) MicroRNA-15a tissue expression is a prognostic marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma, *Clin. Exp. Med.*, **19**, 515-524, doi: 10.1007/s10238-019-00574-7.
15. Shi, L., Wang, M., Li, H., and You, P. (2021) MicroRNAs in body fluids: a more promising biomarker for clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Manag. Res.*, **13**, 7663-7675, doi: 10.2147/CMAR.S330881.
16. Patel, S. H., Singla, N., and Pierorazio, P. M. (2021) Decision-making in active surveillance in kidney cancer: current trends and future urine and tissue markers, *World J. Urol.*, **9**, 2869-2874, doi: 10.1007/s00345-021-03786-3.
17. Voss, M. H., Chen, D., Marker, M., Hakimi, A. A., Lee, C.-H., et al. (2016) Circulating biomarkers and outcome from a randomised phase II trial of sunitinib vs everolimus for patients with metastatic renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer*, **114**, 642-649, doi: 10.1038/bjc.2016.21.
18. Yap, N. Y., Yap, F. N., Perumal, K., and Rajandram, R. (2019) Circulating adiponectin as a biomarker in renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis, *Biomarkers*, **24**, 1-24, doi: 10.1080/1354750X.2019.1634763.
19. Baldin, A. V., Grishina, A. N., Korolev, D. O., Kuznetsova, E. B., Golovastova, M. O., et al. (2019) Autoantibody against arrestin-1 as a potential biomarker of renal cell carcinoma, *Biochimie*, **157**, 26-37, doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.019.
20. Dakubo, G. D. (2019) *Cancer Biomarkers in Body Fluids (Biomarkers in Proximal Fluids)*, doi: 10.1007/978-3-030-24725-6.
21. Flitcroft, J. G., Verheyen, J., Vemulkar, T., Welbourn, E. N., Rossi, S. H., et al. (2022) Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy, *BJU Int.*, **129**, 290-303, doi: 10.1111/bju.15601.
22. Morrissey, J. J., London, A. N., Luo, J., and Kharasch, E. (2010) Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer, *Mayo Clin. Proc.*, **85**, 413-421, doi: 10.4065/mcp.2009.0709.
23. Morrissey, J. J., Mellnick, V. M., Luo, J., Siegel, M. J., Figenshau, R. S., et al. (2015) Evaluation of urine aquaporin-1 and perilipin-2 concentrations as biomarkers to screen for renal cell carcinoma: a prospective cohort study, *JAMA Oncol.*, **1**, 204-212, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0213.
24. Hu, R., Gupta, R., Wang, Z., Wang, C., Sun, H., et al. (2019) Bioplasmonic paper-based assay for perilipin-2 non-invasively detects renal cancer, *Kidney Int.*, **96**, 1417-1421, doi: 10.1016/j.kint.2019.08.020.
25. Papale, M., Vocino, G., Lucarelli, G., Rutigliano, M., Gigante, M., et al. (2017) Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget*, **8**, 40412-40424, doi: 10.18632/oncotarget.16341.
26. Di Meo, A., Batruch, I., Brown, M. D., Yang, C., Finelli, A., et al. (2020) Searching for prognostic biomarkers for small renal masses in the urinary proteome, *Int. J. Cancer*, **146**, 2315-2325, doi: 10.1002/ijc.32650.
27. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Vinarov, A. Z., Zamyatnin, A. A., and Shlyapnikova, E. A. (2021) Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 620687, doi: 10.3389/fmolb.2020.620687.
28. Golovastova, M. O., Tsoy, L. V., Bocharnikova, A. V., Korolev, D. O., Gancharova, O. S., et al. (2016) The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumours, *Tumour Biol.*, **37**, 9899-9907, doi: 10.1007/s13277-016-4885-5.
29. Chen, H., Werner, S., Tao, S., Zornig, I., and Brenner, H. (2014) Blood autoantibodies against tumour-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer, *Cancer Lett.*, **346**, 178-187, doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.007.
30. Savchenko, M. S., Goncharskaia, M. A., Skorikova, E. E., Eichmuller, S. B., Kushlinsky, N. E., et al. (2012) Autoantibodies against the Ca²⁺-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological diseases, *Oncol. Lett.*, **3**, 377-382, doi: 10.3892/ol.2011.464.
31. Bazhin, A., Dalke, C., Willner, N., Abschutz, O., Wildberger, H., et al. (2009) Cancer-retina antigens as potential paraneoplastic antigens in melanoma associated retinopathy, *Int. J. Cancer*, **124**, 140149, doi: 10.1002/ijc.23909.
32. Potter, M. J., Adamus, G., Szabo, S. M., Lee, R., Mohaseb, K., et al. (2002) Autoantibodies to transducin in a patient with melanoma associated retinopathy, *Am. J. Ophthalmol.*, **134**, 128130, doi: 10.1016/s0002-9394(02)01431-9.

33. Morozov, V. N., Groves, S., Turell, M. J., and Bailey, C. J. (2007) Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic beads detection, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12628-12629, doi: 10.1021/ja075069m.
34. Shlyapnikov, Y. M., Shlyapnikova, E. A., Simonova, M. A., Shepelyakovskaya, A. O., Brovko, F. A., et al. (2012) Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins, *Anal. Chem.*, **84**, 5596-5603, doi: 10.1021/ac300567f.
35. Morozov, V. N., Nikolaev, A. A., Shlyapnikov, Y. M., Mikheev, A. Y., Shlyapnikova, E. A., et al. (2018) Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using microdroplets collected from exhaled air, *J. Breath Res.*, **12**, 036010, doi: 10.1088/1752-7163/aab3f2.
36. Morozov, V. N., and Morozova, T. Ya. (2006) Active bead-linked immunoassay on protein microarrays, *Anal. Chim. Acta*, **564**, 40-52, doi: 10.1016/j.aca.2005.09.068.
37. Hanley, J. A., and McNeil, B. J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology*, **143**, 29-36, doi: 10.1148/radiology.143.1.7063747.
38. Matsuo, S., Ohguro, H., Ohguro, I., and Nakazawa, M. (2010) Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumour cells, *Ophthalmic Res.*, **43**, 139-144, doi: 10.1159/000253486.
39. Ohguro, H., Odagiri, H., Miyagawa, Y., Ohguro, I., Sasak, M., et al. (2004) Clinicopathological features of gastric cancer cases and aberrantly expressed recoverin, *Tohoku J. Exp. Med.*, **202**, 213-219, doi: 10.1620/tjem.202.213.
40. Závada, J., Závadová, Z., Zát'ovičová, M., Hyřl, L., and Kawaciuk, I. (2003) Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients, *Br. J. Cancer*, **89**, 1067-1071, doi: 10.1038/sj.bjc.6601264.
41. Morozova, T. Ya., and Morozov, V. N. (2008) Force differentiation in recognition of cross-reactive antigens by magnetic beads, *Anal. Biochem.*, **374**, 263-271, doi: 10.1016/j.ab.2007.12.007.

NON-INVASIVE KIDNEY CANCER DIAGNOSTICS USING ULTRASENSITIVE IMMUNODETECTION OF CANCER-RETINA ANTIGENS

**Yuri M. Shlyapnikov^{1*}, Ekaterina A. Malakhova¹, Natalia V. Potoldykova²,
Yana A. Svetocheva², Andrei Z. Vinarov², Dmitry V. Zinchenko³, Evgeni Yu. Zernii⁴,
Andrey A. Zamyatnin, Jr.^{4,5,6,7}, and Elena A. Shlyapnikova¹**

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

² *Institute for Urology and Reproductive Health, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: avinarov@mail.ru*

³ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117437 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: zdv@bibch.ru*

⁴ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: zerni@belozersky.msu.ru*

⁵ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru*

⁶ *Department of Biotechnology, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

⁷ *Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, Surrey, UK*

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common urological malignancy with a high mortality and low detection rate. One of the approaches to improving its diagnostics may be the search for new non-invasive biomarkers in liquid biopsy and development of more sensitive methods for their detection. Cancer-retina antigens, which are known to be aberrantly expressed in malignant tumors, are present in liquid biopsy at extremely low concentrations. Using the developed multiplex immunoassay with a detection limit of 0.1 pg/ml, urine and serum samples of 89 patients with RCC and 50 non-cancer patients were examined for the presence of cancer-retina antigens (arrestin, recoverin, rhodopsin kinase, and transducin); the difference between the RCC and control groups was evaluated with the χ^2 test. The results showed high diagnostic efficiency of a combination of arrestin and recoverin: at a threshold of 0.1 pg/ml, the sensitivity was 96%, specificity 92%, and AUC = 0.96 (95% confidence interval, 0.93-0.99). Seven days after nephrectomy, the concentration of the antigens returned to the level characteristic of the control group. Therefore, arrestin in a combination with recoverin can serve as a diagnostic non-invasive urinary biomarker of RCC.

Keywords: cancer-retina antigens, renal cell carcinoma, immunoassay, magnetic particles

МОЖНО ЛИ РАССМАТРИВАТЬ ФЕТУИН-А В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРА РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ЗАДЕРЖКИ КОГНИТИВНОГО РАЗВИТИЯ?

© 2022 N. Kurt^{1*}, F.B. Ozgeris², I. Ucuз³, Z. Bayraktutan⁴, K.K. Yilmaz⁵,
E.Y. Demirdogen⁶, A. Cayir⁷

¹ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yildirim University, Erzincan, Turkey; e-mail: nezahat.kurt@erzincan.edu.tr

² Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Ataturk University, Erzurum, Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr

³ Department of Child and Adolescent Psychiatry, Inonu University, Faculty of Medicine, Malatya, Turkey; e-mail: ilknur.ucuz@inonu.edu.tr

⁴ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey; e-mail: zafer.bayraktutan@atauni.edu.tr

⁵ Specialist of Child and Adolescent Psychiatry, Independent Researcher, Istanbul, Turkey; e-mail: kubrakocak82@hotmail.com

⁶ Department of Child and Adolescent Psychiatry, Ataturk University, Faculty of Medicine, Erzurum, Turkey; e-mail: esen.yildirim@atauni.edu.tr

⁷ Department of Pediatric Endocrinology, Erzurum Regional Training and Research Hospital, Erzurum, Turkey; e-mail: dratillacayir@gmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2022

После доработки 09.05.2022

Принята к публикации 26.05.2022

Раннее выявление задержки психического развития (ЗПР) и расстройств аутистического спектра (РАС) является сложной задачей, несмотря на многочисленные научные исследования и разработку различных терапевтических стратегий. Отсутствие биомаркеров аутизма является лимитирующим фактором для проведения ранней диагностики, которая могла бы обеспечить наилучший прогноз, благодаря началу лечения на ранних стадиях. Поскольку при внутриутробном развитии концентрация фетуина-А в сыворотке крови повышается, было высказано предположение, что он может играть роль в развитии мозга. В настоящей работе мы попытались определить возможность использования фетуина-А, мультифункционального гликопротеина, в качестве биомаркера для диагностики РАС и задержки развития. В настоящем исследовании принимали участие 55 детей с задержкой психического развития и 40 здоровых детей. Участники исследования были обследованы психиатрами, а также проходили ряд тестов по определению уровня развития. Дети с задержкой когнитивного развития были классифицированы по двум категориям. Из 55 детей у 54,5% наблюдалась ЗПР, в то время как у 45,5% детей было диагностировано РАС. Уровни сывороточного фетуина-А определяли на спектрофотометре с использованием специфического набора для проведения иммуноферментного анализа количества белка (ELISA). Было показано, что уровень сывороточного фетуина-А у детей из тестируемой группы существенно ниже, чем у здоровых детей ($p < 0,001$). С использованием ROC-анализа пороговый уровень концентрации фетуина-А в сыворотке крови при ЗПР и РАС был определен равным 518 г/л (чувствительность – 84,6%, специфичность – 91,4%, AUC: 0,95, $p < 0,001$). Полученные данные позволяют предположить, что уровень сывороточного фетуина-А может быть использован для диагностики расстройств аутистического спектра и задержки психического развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фетуин-А, расстройство аутистического спектра, задержка психического развития, биомаркер, нарушение развития нервной системы.

DOI: 10.31857/S0320972522070053, EDN: AVRCPX

ВВЕДЕНИЕ

Неадекватное развитие когнитивных способностей принято описывать как задержку психического развития (ЗПР), при которой

общие психические функции развиты значительно ниже среднего, а также снижена приспособляемость к окружающей среде в ходе когнитивного развития [1]. Интеллектуальная недостаточность вызывается целым рядом

Принятые сокращения: ЗПР – задержка психического развития; РАС – расстройство аутистического спектра.

* Адресат для корреспонденции.

причин, включая внутриутробные травмы, инфекции, генетические нарушения, проблемы обмена веществ и воздействие токсинов окружающей среды. Однако в большинстве случаев определить точную причину ее возникновения не оказывается возможным [2].

Расстройство аутистического спектра (РАС) – это неврологическое расстройство, характеризующееся низкой коммуникативной способностью, языковыми и речевыми трудностями, ограниченностью интересов и повторяющимися паттернами поведения [3]. Согласно последним исследованиям, распространенность этого расстройства постоянно растет. По современным данным, расстройство аутистического спектра наблюдается у 0,1%–1% населения [4]. Несмотря на значительное число проведенных исследований, направленных на выявление этиологии этого расстройства, причина его возникновения не была выяснена [5]. Ранняя диагностика аутизма остается сложной задачей, несмотря на предпринятые многочисленные научные и клинические усилия. Существенным ограничением является отсутствие биомаркера для выявления РАС, способным обеспечить раннее выявление заболевания и начало терапевтических мероприятий для достижения наилучшего прогноза.

Фетуин-А представляет собой мультифункциональный белок, регулирующий уровень внеклеточного кальция. Он является естественным участником различных нормальных и патологических процессов, протекающих, в том числе, с участием гормона роста (GH, growth hormone) и фактора роста нервов (NGF, nerve growth factor) [6]. Согласно когортным исследованиям, уровень фетуина-А постепенно снижается в процессе внутриутробного развития, достигая уровня взрослого человека примерно к 37-й неделе беременности. Высокие концентрации сывороточного фетуина-А на протяжении внутриутробного развития позволили предположить, что данный белок может играть роль в развитии мозга [7]. Кроме того, в ряде работ фетуин-А в больших количествах был обнаружен в спинномозговой жидкости и в отдельных участках мозга [8]. В другой работе было показано, что фетуин-А обладает нейротрофическими свойствами [9]. Он также является негативным реактантом острой фазы воспаления, и провоспалительные цитокины ингибируют синтез фетуина-А [10].

Недавно в нескольких работах было показано, что у больных с РАС повышены уровни ряда цитокинов [11, 12]. При этом выше мы отметили, что провоспалительные цитокины ингибируют синтез фетуина-А. В свете этих данных мы

предположили, что повышенные уровни цитокинов у больных с РАС могут иметь отношение к уровню фетуина-А. В настоящей работе была предпринята попытка определить сывороточные уровни фетуина-А, который может играть роль как в биосинтезе цитокинов, так и в развитии мозга, у детей с расстройством аутистического спектра и задержкой когнитивного развития, а также изучить возможность использования значений уровня этого белка для облегчения диагностики указанных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План исследования был одобрен Этическим комитетом клинических исследований медицинского факультета Университета имени Ататюрка (B.30.2.ATA0.01.00/28), информированное согласие получено от всех участников исследования.

В исследуемую группу вошли 55 детей (PG, patient group) в возрасте от 2 до 5 лет с жалобами на задержку психического развития, проходящих лечение в Психиатрической клинике для детей и подростков медицинского факультета Университета имени Ататюрка, и 40 детей без каких-либо проблем со здоровьем в качестве контрольной группы (CG, control group), которые по возрасту и полу соответствовали группе пациентов.

Все пациенты, чьи представители дали согласие на участие в данном исследовании, были обследованы детскими и подростковыми психиатрами согласно Руководству по диагностике и статистике психических расстройств 5-го издания (DSM-5, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). В случае клинических кейсов оценка проводилась с использованием Денверского скринингового теста (Denver II, Denver Developmental Screening Test II) и скрининговых тестов развития (Анкара) (ADSI, Ankara Developmental Screening Inventory). Кроме того, родственникам детей попросили заполнить анкету для анализа поведения при аутизме (ABC, autism behavior checklist), а также оценить поведение по специальной шкале для детей в возрасте от 1,5 до 5 лет (CBCL 1.5-5, Child Behavior Checklist). В результате проведения этих оценок были сформированы две основные диагностические группы: дети с задержкой психического развития (группа ЗПР) и дети, у которых одновременно наблюдается задержка психического развития и расстройство аутистического спектра (группа ЗПР + РАС). Дети с известными хроническими заболеваниями или нуждающиеся в постоянном приеме лекарств были исключены из контрольной группы.

Биохимический анализ. Образцы крови от всех участников исследования были помещены в пробирки для получения сыворотки, которые подвергались центрифугированию при 1000 g в течение 15 мин. Все образцы сыворотки крови хранили при -80°C до их использования в проведении анализа. Концентрацию фетуина-А в образцах сыворотки крови определяли с использованием иммуноферментного анализа (ELISA) и специфического набора для определения этого белка (Fetuin-A ELISA kit; Ref No. DK0128, «DiaMetra», Италия). В день проведения исследования образцы сыворотки крови и реактивы для иммуноферментного анализа выдерживали при комнатной температуре в течение примерно 2 ч. Для анализа использовали 100 мкл образца сыворотки крови. Исследование проводили в соответствии с инструкцией производителя. Определение содержания фетуина-А проводили с помощью спектрофотометра, снабженного микропланшетным ридером (XS Powerwave, «BioTek», США). Концентрацию фетуина-А в образцах сыворотки крови выражали в мкг/л.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS, v.20.0, для Windows («IBM Inc.», США). Для определения нормального распределения переменные величины анализировали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартного отклонения (Mean \pm SD) или медианы, минимального и максимального значения (Med, Min-Max). Различия в параметрических и непараметрических данных между группами рассчитывали с использованием критерия Стьюдента и *U*-теста Манна–Уитни соответственно. Корреляцию определяли с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Для оценки отношения шансов (OR, Odds Ratio) использовали метод логистической регрессии. ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic)

применялся для определения возможности использования непрерывной переменной величины в диагностике, а также для определения порогового значения, положительной прогностической ценности (PPV, Positive Predictive Value), отрицательной прогностической ценности (NPV) и площади под кривой (AUC, Area Under the Curve). Данные считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 представлены демографические данные всех участников исследования. Не было выявлено статистически значимых различий в средних значениях возраста и индекса массы тела (BMI, body mass index) между группой пациентов и контрольной группой детей ($p = 0,893$ и $p = 0,359$ соответственно). У 54,5% ($n = 30$) из 55 пациентов наблюдалась только задержка психического развития, в то время как у 45,5% ($n = 25$) – как задержка психического развития, так и расстройство аутистического спектра. Результаты оценки пациентов по подгруппам представлены в табл. 2.

Концентрация фетуина-А в сыворотке крови составила $435,5 \pm 90,1$ мкг/л в группе пациентов и $654,6 \pm 98,2$ мкг/л – в контрольной группе. Оказалось, что для группы пациентов характерно существенное снижение уровня фетуина-А ($p < 0,001$). Результаты сравнения двух групп показаны на рис. 1.

Как в контрольной группе, так и в группе пациентов не было выявлено статистически достоверных различий по уровню фетуина-А в подгруппах мужского и женского пола ($p > 0,05$) (табл. 3).

Не было обнаружено статистически достоверных различий сывороточных уровней фетуина-А между подгруппами пациентов – ЗПР и ЗПР + РАС ($426,9 \pm 90,8$ и $449,4 \pm 74,8$ г/л соответственно, $p = 0,382$) (рис. 2).

Таблица 1. Демографические характеристики группы пациентов и контрольной группы

Показатели	Группа пациентов ($n = 55$)			Контрольная группа ($n = 40$)
	Группа с ЗПР ($n = 30$)	Группа с ЗПР + РАС ($n = 25$)	Общие	
Возраст (лет)	$3,7 \pm 0,9$	$3,3 \pm 0,9$	$3,5 \pm 0,9$	$3,8 \pm 1,0$
Пол (женский/мужской)	17/18	6/19	20/35	20/24
BMI	$16,9 \pm 1,18$	$17,3 \pm 1,13$	$17,11 \pm 1,17$	$17,3 \pm 1,07$

Примечание. ЗПР – задержка психического развития; РАС – расстройство аутистического спектра; BMI – индекс массы тела.

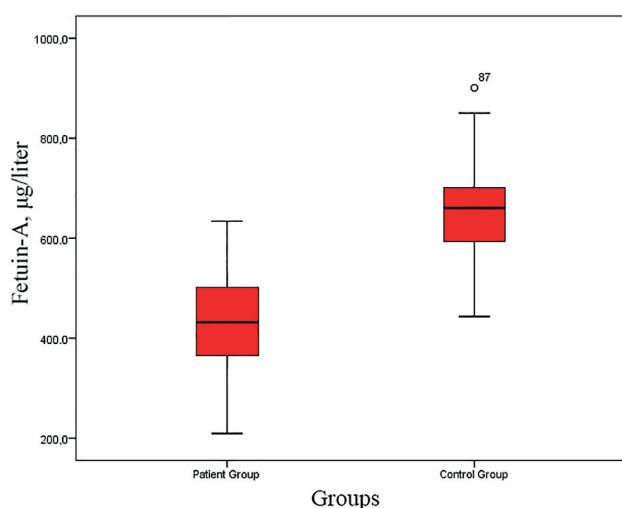
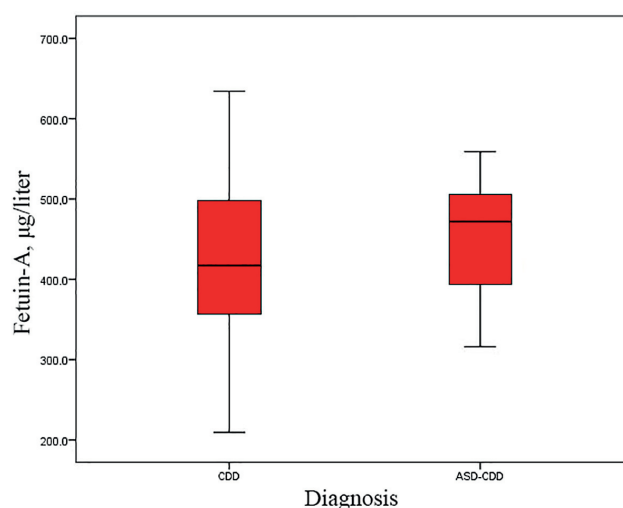
Таблица 2. Оценки групп пациентов по результатам тестов

Показатели	Группа с ЗПР ($n = 30$)	Группа с ЗПР + РАС ($n = 25$)	Всего ($n = 55$)
Балл по Денверской шкале	76,8 ± 16,0	75,0 ± 16,9	75,9 ± 15,7
Балл по шкале ADOS	79,9 ± 14,7	77,1 ± 16,4	79,1 ± 15,3
Балл по шкале CBCL	61,4 ± 35,3	54,5 ± 34,1	58,8 ± 34,7
Балл по шкале ABC	46,7 ± 30,3	53,9 ± 30,3	49,5 ± 30,2

Примечание. ЗПР – задержка психического развития; РАС – расстройство аутистического спектра; ADOS – скрининговый тест развития (Анкара); ABC – анализ поведения при аутизме; CBCL – шкала оценки поведения детей в возрасте от 1,5 до 5 лет.

Таблица 3. Уровень фетуина-А в сыворотке участников исследования мужского и женского пола в группе пациентов и в контрольной группе

Показатели	Группа пациентов ($n = 55$)		p -value	Контрольная группа ($n = 40$)		p -value
	мужской	женский		мужской	женский	
Фетуин-А (мкг/л)	439,9 ± 90,2	427,1 ± 91,7	0,630	630,5 ± 93,5	686,6 ± 98,2	0,099

**Рис. 1.** Диаграмма уровней фетуина-А в сыворотке крови в группе пациентов и в контрольной группе ($p < 0,001$). Отдельно отмечено значение для пациента с идентификатором «87» (выброс)**Рис. 2.** Диаграмма уровней фетуина-А в сыворотке крови пациентов подгрупп ЗПР и ЗПР + РАС ($p > 0,05$)

Оценку возможности использования значения уровня фетуина-А в качестве биомаркера ЗПР и РАС проводили с использованием ROC-анализа. Для уровней фетуина-А были показаны значимые AUC и p -value, таким образом, они могут быть использованы для оценки различий между пациентами и здоровыми волонтерами. Пороговое значение уровня фетуина-А было определено как 518 мкг/л, и значения положительной и отрицательной прогностической ценности (PPV и NPV) были рассчитаны с использованием этого показателя. Результаты ROC-анализа представлены в табл. 4 и на рис. 3.

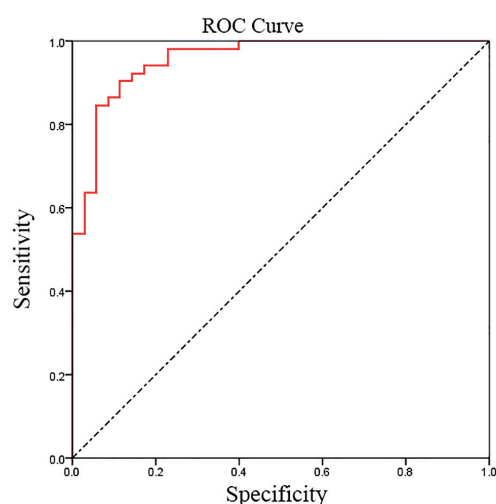
**Рис. 3.** ROC-кривая для уровней фетуина-А

Таблица 4. Результаты ROC-анализа сывороточного фетуина-А

	AUC (CI%)	<i>p</i> -value	Чувствительность, %	Специфичность, %	PPV (CI%)	NPV (CI%)
Фетуин-А	0,957 (91,7–99,6)	0,000	84,6	91,4	90,4 (80,4–95,5)	81,4 (69,5–89,5)

Примечание. AUC – площадь под кривой; PPV – положительная прогностическая ценность; NPV – отрицательная прогностическая ценность; CI – доверительный интервал.

Таблица 5. Корреляция значений уровня фетуина-А и различных шкал оценки когнитивных функций (нарушений)

		Денвер	ADSI	CBCL	ABC
Фетуин-А	<i>r</i> -value	–0,065	0,006	0,043	0,092
	<i>p</i> -value	0,641	0,966	0,759	0,508

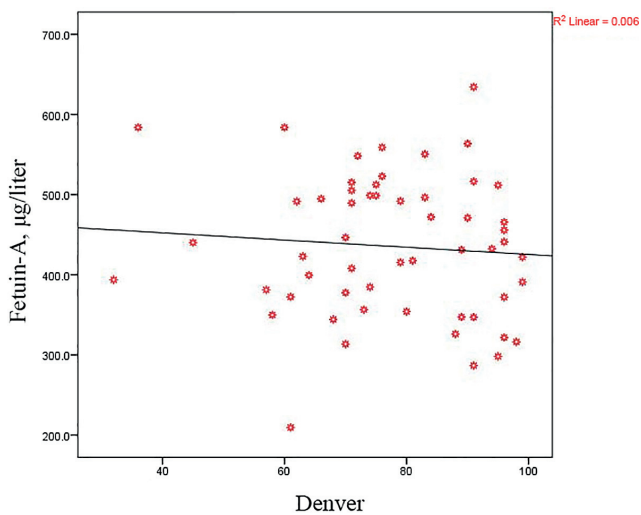


Рис. 4. Точечная диаграмма уровней фетуина-А и значений по Денверской шкале

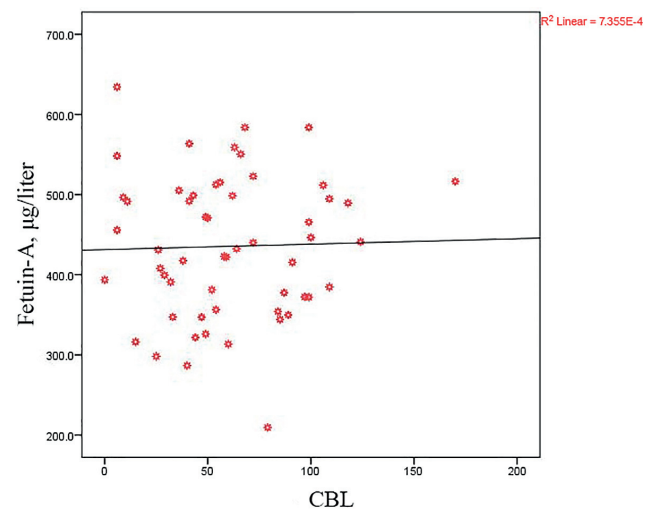


Рис. 5. Точечная диаграмма уровней фетуина-А и значений по шкале CBCL

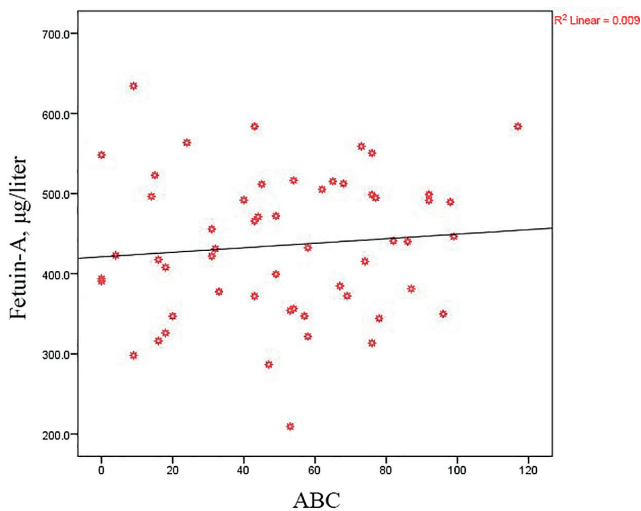


Рис. 6. Точечная диаграмма уровней фетуина-А и значений по шкале ABC

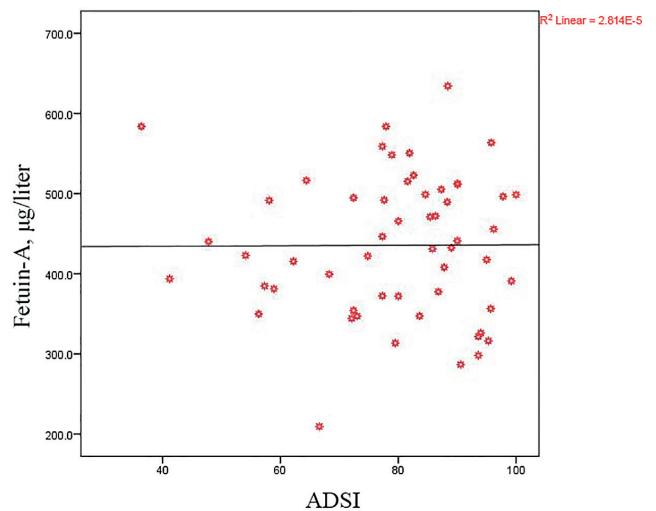


Рис. 7. Точечная диаграмма уровней фетуина-А и значений по шкале ADSI

Вероятность задержки психического развития оценивали как отношение шансов (OR – odds ratio), равное 2,6 [CI: 2,47–6,11], основываясь на высоком значении концентрации фетуина-А (> 518 мкг/л). Было показано, что дети с низким уровнем фетуина-А относительно детей из контрольной группы в 2,6 раза более вероятно подвержены задержке психического развития, чем дети с высоким уровнем фетуина-А.

Анализ соответствия между уровнем фетуина-А и оценками по Денверской шкале, CBL, ABC и ADOS не выявил наличие корреляции. В табл. 5 показаны результаты оценки корреляции, и на рис. 4–7 представлены графики корреляции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Это первое, насколько нам известно, исследование по оценке сывороточного уровня фетуина-А, играющего роль в развитии мозга, у детей с задержкой психического развития и расстройством аутистического спектра. Впервые предпринята попытка оценить потенциал использования уровня фетуина-А в качестве биомаркера этих состояний. Согласно полученным нами результатам, уровень фетуина-А был значительно снижен у детей с задержкой психического развития и аутистическими расстройствами по сравнению со здоровыми детьми из контрольной группы. При проведении оценки возможности использования этих различий в качестве биомаркера задержки психического развития с помощью ROC-анализа было показано значимое значение AUC. Таким образом, мы показали, что низкие сывороточные уровни фетуина-А обладают высоким положительным прогностическим значением в предсказании задержки психического развития и аутистических расстройств.

Недавно были проведены исследования влияния фетуина-А на когнитивные функции, в частности, при нейродегенеративных процессах. Согласно исследованиям «The Healthy ABC» и «Rancho Bernardo», уровень фетуина-А у пожилых людей с возрастом понижается [13, 14]. В своей работе Laughlin et al. [15] показали, что уровень фетуина-А является маркером снижения когнитивных функций. В этой работе с участием 1382 гериатрических больных было продемонстрировано, что люди с более высоким уровнем фетуина-А лучше проходят тестирование на внимательность, речь, память, способность

считать, ориентироваться в пространстве. В той же работе при когортном 4-летнем исследовании 855 людей было обнаружено, что высокие уровни фетуина-А были связаны со снижением вероятности утраты когнитивных способностей.

В другой работе, посвященной изучению связи между нарушением когнитивных функций и фетуином-А, было показано, что уровни этого белка в плазме крови больных с легким течением болезни Альцгеймера значительно ниже, чем в контрольной группе. У пациентов с болезнью Альцгеймера легкой или средней тяжести снижение концентрации фетуина-А в плазме крови прямо связано со степенью нарушения когнитивных функций [16]. Сниженная концентрация фетуина-А в спинномозговой жидкости и плазме у пациентов с болезнью Альцгеймера указывает на то, что уровень фетуина-А может быть биомаркером для ранней диагностики заболевания [17, 18]. В генетическом исследовании семи родственных больных с синдромом алопеции и умственной отсталости (APMR – alopecia-mental retardation syndrome), редкого аутосомно-рецессивного нейродермального заболевания, была выявлена мутация в гене фетуина-А (*AHSG*) [19]. В отличие от растущего числа публикаций по нейродегенеративным заболеваниям, имеется лишь несколько исследований, касающихся нарушения развития нервной системы, влияющих на когнитивные процессы. В настоящем исследовании было показано, что у детей с задержкой психического развития и аутистическими расстройствами понижена концентрация фетуина-А. Эти заболевания, вызванные нарушением развития нервной системы, связаны с аномалиями развития мозга на ранних стадиях жизни. ROC-анализ, проведенный для оценки различий уровня фетуина-А между детьми с задержкой развития и здоровыми детьми, показал высокие значения чувствительности и специфичности. Тем не менее не было выявлено какой-либо ассоциации между уровнем фетуина-А и значением по шкале оценки когнитивного развития. Это противоречит результатам предыдущего исследования, согласно которым падение уровня фетуина-А коррелирует с тяжестью когнитивных нарушений. С другой стороны, тот факт, что не было выявлено какой-либо разницы между сывороточными уровнями фетуина-А у больных из подгрупп с ЗПР и ЗПР + РАС, может свидетельствовать в пользу выдвинутого ранее предположения, что уровень фетуина-А скорее оказывает влияние на когнитивные

функции, а не является ассоциированным с каким-либо конкретным заболеванием.

Другой функцией фетуина-А является его участие в воспалительных процессах. Фетуин-А подавляет воспалительные процессы путем ингибирования образования цитокинов макрофагами в присутствии спермина [20]. Низкие уровни фетуина-А также ассоциированы с повышением провоспалительных цитокинов [21, 22]. При этом повышенные уровни TNF и IL-6 вызывают подавление экспрессии фетуина-А. Было обнаружено, что у детей с РАС наблюдаются отклонения значений провоспалительных и иммуновоспалительных факторов. Хотя точный патофизиологический механизм, лежащий в основе возникновения РАС, до сих пор не определен, в ряде работ было высказано предположение, что развитие этого состояния может быть связано с отклонениями уровней воспалительных факторов. Sasayama et al. [12] продемонстрировали наличие отрицательной связи между уровнями IFN и IL-6 и когнитивным развитием детей из группы с РАС, в то время как Ghaffari et al. [23] показали, что уровни TNF гораздо выше у детей с РАС в сравнении с контрольной группой здоровых детей. В предыдущей работе нами было показано, что у больных с задержкой психического развития наблюдаются пониженные уровни програнулина, аутокринного фактора роста и провоспалительного фактора [24]. Согласно исследованиям цитокинов у больных с задержкой психического развития, повышение уровня цитокинов во время вынашивания плода происходит в основном из-за воспалительных процессов и приводит к возникновению предрасположенности к интеллектуальной недостаточности в более позднем возрасте [25, 26]. По нашим сведениям, единственная работа по изучению уровней фетуина-А у детей с РАС была выполнена Al-Ayadhi et al. [27]. Они обследовали 46 пациентов с РАС и 44 здоровых человека, выявив значительное снижение уровня фетуина-А в группе РАС, независимо от тяжести проявлений аутизма. Однако ROC-анализ для определения значимости этих различий они не проводили. Они также пришли к заключению об отсутствии корреляции между уровнем фетуина-А и значениями согласно различным методикам оценки поведения и когнитивного развития [27]. Выявленные в нашей работе низкие концентрации фетуина-А у детей с ЗПР и РАС согласуются с предыдущими исследова-

ниями. В нашей работе также не было выявлено корреляции между значениями по шкале когнитивного развития и уровнем фетуина-А.

Несмотря на то что в нашей работе были получены важные результаты, их значимость ограничена небольшим размером выборки. Для проверки эффективности биомаркеров необходимо провести исследования больших когортных групп пациентов, а также изучить экспрессию конкретного гена с использованием метода вестерн-блоттинга для оценки биосинтеза этого белка. Кроме того, нам не удалось провести оценку уровня фетуина-А у детей с РАС без задержки психического развития. Кроме того, на основании полученных нами результатов, не ясно, является ли высокий уровень цитокинов, о котором сообщалось в предыдущих исследованиях, причиной снижения уровня фетуина-А или следствием низкого уровня фетуина-А.

В заключение можно констатировать, что уровни фетуина-А были существенно понижены у детей с задержкой психического развития и аутистическими расстройствами в сравнении со здоровыми детьми из контрольной группы, и это различие имело сильную прогностическую ценность. Было выявлено, что низкий уровень фетуина-А ассоциирован с увеличением вероятности задержки когнитивного развития в 2,6 раза. На основании этих результатов мы предположили, что уровни фетуина-А могут быть использованы в качестве полезного индикатора в лабораторной оценке детей с ЗПР и РАС. Кроме того, вероятно, в новых работах было бы интересно исследовать эффект применения фетуина-А на развитие когнитивных функций.

Благодарности. Авторы выражают благодарность всем медицинским работникам, принимавшим участие в получении образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с участием людей выполнялись в соответствии с Институциональными этическими стандартами, а также стандартами Национального этического комитета и Хельсинкской декларацией 1964 г. и последующими ее дополнениями. Проведение работы было одобрено комитетом по этике клинических исследований университета имени Ататюрка (№ В.30.2.АТА0.01.00/28).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Petersen, M. C., Kube, D. A., and Palmer, F. B. (1998) Classification of developmental delays, *Semin. Pediatr. Neurol.*, **5**, 2-14, doi: 10.1016/s1071-9091(98)80012-0.
- Flore, L. A., and Milunsky, J. M. (2012) Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability, *Semin. Pediatr. Neurol.*, **19**, 173-180.
- Szatmari, P. (1999) Heterogeneity and the genetics of autism, *J. Psychiatry Neurosci.*, **24**, 159-165.
- Fombonne, E. (1999) The epidemiology of autism: A review, *Psychol. Med.*, **29**, 769-786.
- Betancur, C. (2011) Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting, *Brain Res.*, **1380**, 42-77, doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.078.
- Mori, K., Emoto, M., and Inaba, M. (2011) Fetuin-A: A multifunctional protein, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.*, **5**, 124-146.
- Elsas, J., Sellhaus, B., Herrmann, M., Kinkeldey, A., Weis, J., et al. (2013) Fetuin-A in the developing brain, *Dev. Neurobiol.*, **73**, 354-369, doi: 10.1002/dneu.22064.
- Dziegielewska, K. M., Matthews, N., Saunders, N. R., and Wilkinson, G. (1993) A2Hs-Glycoprotein is expressed at high concentration in human fetal plasma and cerebrospinal fluid, *Fetal Diagn. Ther.*, **8**, 22-27, doi: 10.1159/000263743.
- Wang, H., Li, W., Zhu, S., Li, J., D'Amore, J., et al. (2010) Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 493-504.
- Daveau, M., Davrinche, C., Julien, N., Hiron, M., Arnaud, P., et al. (1988) The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells, *FEBS Lett.*, **241**, 191-194, doi: 10.1016/0014-5793(88)81059-7.
- AL-Ayadhi, L. Y., and Mostafa, G. A. (2012) Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 1-6.
- Sasayama, D., Kurahashi, K., Oda, K., Yasaki, T., and Yamada, Y. (2017) Negative correlation between serum cytokine levels and cognitive abilities in children with autism spectrum disorder, *J. Intell.*, **6**, 2-8, doi: 10.3390/jintelligence5020019.
- Ix, J. H., Wassel, C. L., Kanaya, A. M., Vittinghoff, E., Johnson, K. C., et al. (2008) Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons, *J. Am. Med. Assoc.*, **300**, 182-188, doi: 10.1001/jama.300.2.182.
- Laughlin, G. A., Cummins, K. M., Wassel, C. L., Daniels, L. B., and Ix, J. H. (2012) The association of fetuin-A with cardiovascular disease mortality in older community-dwelling adults: The Rancho Bernardo study, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **59**, 1688-1696, doi: 10.1016/j.jacc.2012.01.038.
- Laughlin, G. A., McEvoy, L. K., Barrett-Connor, E., Daniels, L. B., and Ix, J. H. (2014) Fetuin-A, a new vascular biomarker of cognitive decline in older adults, *Clin. Endocrinol.*, **81**, 134-140.
- Smith, E. R., Nilforooshan, R., Weaving, G., and Tabet, N. (2011) Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **24**, 327-333, doi: 10.3233/JAD-2011-101872.
- Kitamura, Y., Usami, R., Ichihara, S., Kida, H., Satoh, M., et al. (2017) Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease, *Neurol. Res.*, **39**, 231-238, doi: 10.1080/01616412.2017.1281195.
- Puchades, M., Hansson, S. F., Nilsson, C. L., Andreassen, N., Blennow, K., et al. (2003) Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease, *Mol. Brain Res.*, **118**, 140-146, doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.08.005.
- Sailani, M. R., Jahanbani, F., Nasiri, J., Behnam, M., Salehi, M., et al. (2017) Association of AHSG with alopecia and mental retardation (APMR) syndrome, *Hum. Genet.*, **136**, 287-296, doi: 10.1007/s00439-016-1756-5.
- Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P. S., Botchkina, G., et al. (1997) Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response, *J. Exp. Med.*, **185**, 1759-1768, doi: 10.1084/jem.185.10.1759.
- Lebreton, J. P., Joisel, F., Raoult, J. P., Lannuzel, B., Rogez, J. P., et al. (1979) Serum concentration of human alpha2 HS glycoprotein during the inflammatory process. Evidence that alpha2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant, *J. Clin. Invest.*, **64**, 1118-1129, doi: 10.1172/JCI109551.
- Ombrellino, M., Wang, H., Yang, H., Zhang, M., Vishnubhakat, J., et al. (2001) Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan, *Shock*, **15**, 181-185, doi: 10.1097/00024382-200115030-00004.
- Ghaffari, M. A., Mousavinejad, E., Riahi, F., Mousavinejad, M., and Afsharmanesh, M. R. (2016) Increased serum levels of tumor necrosis factor-alpha, resistin, and visfatin in the children with autism spectrum disorders: A Case-Control Study, *Neurol. Res. Int.*, **2016**, 1-7, doi: 10.1155/2016/9060751.
- Özgeriş, F. B., Kurt, N., Ucuz, I. I., Yilmaz, K. K., Keleş, M. S., et al. (2022) Is serum progranulin level a biomarker in autism and cognitive development disorders? *Eur. J. Med.*, **54**, 48-48, doi: 10.5152/eurasianjmed.2022.21292.
- Ratnayake, U., Quinn, T., Walker, D. W., and Dickinson, H. (2013) Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness, *Front. Neurosci.*, **7**, 1-9, doi: 10.3389/fnins.2013.00180.
- Varner, M. W., Marshall, N. E., Rouse, D. J., Jablonski, K. A., Leveno, K. J., et al. (2015) The association of cord serum cytokines with neurodevelopmental outcomes, *Am. J. Perinatol.*, **30**, 115-122, doi: 10.1055/s-0034-1376185.
- Al-Ayadhi, L. Y., Alghamdi, F. A., Altamimi, L. A., Alsughayer, L. Y., Alhowikan, A. M., et al. (2021) The possible link between fetuin-A protein and neuro-inflammation in children with autism spectrum disorder, *Pak. J. Med. Sci.*, **37**, 1166-1171, doi: 10.12669/pjms.37.4.4032.

COULD FETUIN-A BE A BIOMARKER FOR AUTISM SPECTRUM DISORDER AND COGNITIVE DEVELOPMENTAL DELAY?

N. Kurt^{1*}, F. B. Ozgeris², I. Ucuz³, Z. Bayraktutan⁴, K. K. Yilmaz⁵,
E. Y. Demirdogen⁶, and A. Cayir⁷

¹ *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yildirim University, Erzincan, Turkey; e-mail: nezahat.kurt@erzincan.edu.tr*

² *Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Ataturk University, Erzurum, Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr*

³ *Department of Child and Adolescent Psychiatry, Inonu University, Faculty of Medicine, Malatya, Turkey; e-mail: ilknur.ucuz@inonu.edu.tr*

⁴ *Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey; e-mail: zafer.bayraktutan@atauni.edu.tr*

⁵ *Specialist of Child and Adolescent Psychiatry, Independent Researcher, Istanbul, Turkey; e-mail: kubrakocak82@hotmail.com*

⁶ *Department of Child and Adolescent Psychiatry, Ataturk University, Faculty of Medicine, Erzurum, Turkey; e-mail: esen.yildirim@atauniedu.tr*

⁷ *Department of Pediatric Endocrinology, Erzurum Regional Training and Research Hospital, Erzurum, Turkey; e-mail: dratillacayir@gmail.com*

Early detection of cognitive developmental delay (CDD) and autism spectrum disorder (ASD) is challenging, despite the numerous scientific studies conducted and different therapeutic strategies. Lack of a biomarker for autism is a limiting factor for early diagnosis, which could provide better outcome with early start of therapy. Because of the high serum fetuin-A concentration during intrauterine life, it has been suggested that fetuin-A may have a role in brain development. The current study sought to determine if fetuin-A, a multifunctional glycoprotein thought to have a role in brain development, may be used as a biomarker for the diagnosis of ASD and developmental delay. The study involved 55 children with cognitive developmental delays and 40 healthy children. Two categories of children with cognitive developmental delays were identified. The participants were subjected to a psychiatric assessment as well as developmental testing. Only 54.5% of the 55 individuals had CDD, whereas 45.5% had ASD. Using an ELISA kit, the levels of serum fetuin-A were determined spectrophotometrically. The serum fetuin-A levels in the patients from the test group were found to be significantly lower than in the healthy individuals ($p < 0.001$). The cutoff value for the serum fetuin-A levels for cognitive developmental delay and autism spectrum disorder was 518 $\mu\text{g/liter}$, according to the results of ROC analysis (84.6% sensitivity and 91.4% specificity, AUC: 0.95, $p < 0.001$). The findings suggest that the serum fetuin-A level may be used to diagnose autism spectrum disorder and cognitive developmental delays.

Keywords: fetuin-A, autistic spectrum disorder, cognitive developmental delay, biomarker, neurodevelopmental disorder

КОНЪЮГАТЫ ДЕСМИКОЗИНА С ФРАГМЕНТАМИ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ОНКОЦИНА: СИНТЕЗ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РИБОСОМОЙ

© 2022 З.З. Хайруллина¹, Г.И. Макаров², А.Г. Терещенков³, В.С. Буев⁴,
Д.А. Лукьянов^{1,5}, В.И. Польшаков⁶, В.Н. Ташлицкий¹, И.А. Остерман^{1,5}, Н.В. Сумбатян^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sumbtyan@belozersky.msu.ru

² Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет),
454080 Челябинск, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия

⁵ Сколковский институт науки и технологий, 143025 Сколково, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.05.2022

После доработки 17.06.2022

Принята к публикации 18.06.2022

С целью развития подходов к созданию новых антимикробных соединений осуществлены дизайн и синтез конъюгатов, сочетающих в структуре макролидный антибиотик десмикозин и фрагменты антимикробного пептида онкоцина. Показано, что новые соединения способны связываться с 70S-рибосомами *Escherichia coli* подобно десмикозину и онкоцину, ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro*, а также подавлять рост бактериальных штаммов. Конъюгаты гекса- и тетрапептидных *N*-концевых фрагментов онкоцина с 3,2',4"-триацетилдесмикозином оказались активными в отношении штаммов, резистентных к макролидам. Методом молекулярной динамики найдены структурные особенности взаимодействий этих производных с бактериальными рибосомами, в том числе содержащими мутацию A2059G в 23S РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: макролиды, пептидные производные, антимикробные пептиды, рибосома, молекулярная динамика, рибосомный туннель.

DOI: 10.31857/S0320972522070065, EDN: AVTKLC

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам представляет серьёзную проблему при их применении на практике, и способом решения этой проблемы является

разработка новых эффективных и безопасных антибиотиков. Одним из подходов к созданию новых антимикробных соединений является рациональный дизайн, основанный на знаниях о механизмах действия известных антибиотиков и их молекулярной мишени [1–4].

Принятые сокращения: МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ПТЦ – пептидил-трансферазный центр; РТ – рибосомный туннель; Вос – *трет*-бутилоксикарбонил; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид; DES – десмикозин; DIPEA – диизопропилэтиламин; DMAPI – диметиламинопиридин; DMF – *N,N*-диметилформамид; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; ERY – эритромицин; HBTU – *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурионий гексафторфосфат; HFIP – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол; GABA – 4-аминобутановая кислота; MALDI-TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией методом матричной десорбции; MBS – сайт связывания макролидов (Macrolide Binding Site); ONC – онкоцин 112 (VDKPPYLPRPRPPRrYNG-NH₂); Pip – пиперидин; RMSF – среднеквадратичная флуктуация атомов (Root-Mean-Square Fluctuation); TFA – трифторуксусная кислота; TYL – тилозин.

* Адресат для корреспонденции.

Макролиды представляют собой класс антибиотиков, структура которых включает лактонное кольцо с присоединёнными к нему углеводными остатками; действуя на бактериальные рибосомы, макролиды проявляют активность в отношении многих патогенов, вследствие чего находят широкое применение в медицинской и ветеринарной практике [5–7]. Механизм действия макролидов заключается в том, что антибиотики связываются в начальном участке рибосомного туннеля (РТ) бактерий в непосредственной близости к пептидил-трансферазному центру (ПТЦ) в так называемом сайте связывания макролидов (MBS), при этом макролиды избирательно ингибируют трансляцию бактериальных белков, причём их действие зависит не только от структуры антибиотика, но и от последовательности растущей пептидной цепи, т.е. является контекстно-специфичным [8–10]. Известны различные механизмы формирования резистентности у бактерий к макролидным антибиотикам, среди которых основную роль играет модификация мишени их действия, т.е. нуклеотидов 23S рНК и белков 50S-субъединицы бактериальной рибосомы в области MBS [7, 11, 12]. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате моно- и диметилирования N6-аминогруппы нуклеотида A2058* под действием метилтрансфераз семейства Erm (Erythromycin resistance methyltransferases), метилирования G748, а также некоторых других пуриновых нуклеотидов доменов II и V 23S рНК [13, 14]. Регуляция экспрессии генов устойчивости, в частности тех или иных метилтрансфераз, связана с образованием тройного комплекса рибосома–макролид–растущий пептид [8]. У ряда микроорганизмов устойчивость к макролидам возникает в результате мутаций в домене V 23S рНК, чаще всего встречаются замена нуклеотида A2062 на C (реже – на другие нуклеотиды), мутации A2058G, A2059G и некоторых других нуклеотидных остатков, а также мутации и делеции в белках L4 и L22.

Макролиды на основе 16-членного лактона, основными представителями которых являются антибиотики тилозинового ряда: тилозин (TYL) и десмикозин (DES) [15–17], обладают некоторыми преимуществами по отношению к другим представителям этого класса как за счёт благоприятных фармакологических свойств, так и благодаря их активности в отношении определённых устойчивых штаммов бактерий [18]. Кроме того, антибиотики тило-

зинового ряда оказались способны действовать на некоторые «необычные» рибосомы, в частности рибосомы апикопластов малярийных плазмодиев [19–21] или бактерии вольбахии, внутриклеточного симбионта круглых червей филярий [22], и проявлять активность в отношении возбудителей некоторых трудно поддающихся лечению тропических болезней.

В первые десятилетия после того, как были найдены TYL, DES и другие антибиотики этого ряда, было синтезировано множество их производных по разным функциональным группам лактонного кольца и углеводных остатков, многие из этих аналогов оказались активны в отношении клинически значимых бактериальных штаммов [23–25]. В том числе было показано, что введение заместителей по 4'- и 4"-гидроксилам микаминозы и микарозы приводит к аналогам, способным действовать против устойчивых штаммов бактерий [26, 27]. С тех пор как были расшифрованы структуры бактериальных рибосом и их комплексов с антибиотиками [28–31], появилась возможность не только детального объяснения механизма действия макролидов, механизмов возникновения устойчивости бактерий к ним и причин активности многих синтетических аналогов антибиотиков, но и рационального дизайна аналогов макролидных антибиотиков [32–35]. С целью изучения взаимодействий пептидной цепи с элементами РТ был синтезирован ряд пептидных аналогов TYL, DES и O-микаминозилтилонолида, в которых антибиотик служил якорем для закрепления пептида в РТ [12, 36–38], эти аналоги связывались с бактериальными рибосомами, ингибировали бактериальную трансляцию *in vitro* и проявляли антибиотическую активность, однако не действовали в отношении устойчивых штаммов бактерий.

Около 20 лет назад были описаны антимикробные пептиды онкоцины, а сравнительно недавно было обнаружено, что их действие направлено на рибосомы бактерий [39, 40]. Онкоцины связываются в РТ, практически полностью его блокируя, и препятствуют встраиванию аминоацил-тРНК, что позволяет образоваться инициаторному комплексу, но препятствует следующему шагу трансляции [41, 42]. Ориентация онкоцинов при связывании противоположна ориентации синтезируемой пептидной цепи – N-конец направлен в сторону ПТЦ, а C-конец – в сторону выхода из РТ. Область связывания этих пептидов перекрывается с сайтами связывания большинства антибиотиков, целью которых является рибосома, в частности, макролидов [41, 43, 44].

* Здесь и далее номера н.о. приводятся по последовательности 23S рНК рибосомы *Escherichia coli*.

В настоящей работе с целью развития подходов к созданию новых антимикробных соединений осуществлены дизайн и синтез, протестированы антибактериальные свойства и изучены взаимодействия с рибосомой новых конъюгатов, сочетающих в структуре макролидный антибиотик десмикозин и фрагменты антимикробного пептида онкоцина. Дизайн соединений осуществлён методом статического моделирования; аффинность соединений к рибосомам оценена по вытеснению ими флуоресцентно меченного аналога эритромицина (ERY) из комплексов с 70S-рибосомами *E. coli*; способность новых соединений ингибировать биосинтез белка и подавлять рост бактерий протестирована *in vitro* и на ряде бактериальных штаммов; с помощью метода молекулярной динамики проведён поиск возможных взаимодействий этих соединений в комплексах с бактериальными рибосомами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реагенты и растворители следующего производства: 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (HFIP, «Acros Organics», Бельгия); носитель для твердофазного синтеза, содержащий 2-хлортритилхлоридную группировку (2CTC Resin) и производные L-аминокислот («Iris Biotech», Германия); 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC), *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуроний гексафторфосфат (HBTU), диизопропилэтиламин (DIPEA) («Sigma-Aldrich», США, Швейцария); диметиламинопиридин (DMAP, «Serva», США); 4-аминобутановая кислота (GABA, «Reanal», Венгрия); трифторуксусная кислота (TFA, «PanReac AppliChem», Германия) и абсолютные растворители: метанол («LiChrosolv», Германия); изопропанол, диоксан, пиридин, *N,N*-диметилформамид (DMF), CH_2Cl_2 , ацетонитрил («PanReac AppliChem», США), а также растворители российского производства фирм «Химмед» и «Иреа2000». TYL (4) был выделен из препарата «Тилозин 200» (ЗАО «Нита-Фарм», Россия) с помощью метода колоночной хроматографии на силикагеле в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 15/1$. Флуоресцентное производное эритромицина BODIPY-ERY было синтезировано по известной методике [45].

Хроматография. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 («Merck», Германия); для *колоночной хроматографии* использовали Silica gel 60 (0,063–0,200 мм и 0,04–0,063 мм; «Marcherey Nagel», Германия). Соединения, содержащие группы, поглощающие в УФ-об-

ласти, обнаруживали с помощью УФ-кабинета («Camag», Англия); соединения, содержащие свободные либо защищенные *трет*-бутилоксикарбониллом (Boc) аминогруппы – нингидриновым реактивом.

Аминокислотный анализ осуществляли на анализаторе «Hitachi 835» («Hitachi», Япония). Кислотный гидролиз проводили в запаянных ампулах смесью 6 М HCl и TFA (2/1) при 155 °С в течение 1 ч.

Хромато-масс-спектрометрию осуществляли с помощью системы UPLC/MS/MS, состоящей из хроматографа Acquity UPLC («Waters», США) и квадрупольного масс-спектрометра TQD («Waters») с регистрацией позитивных ионов с помощью метода ESI MS, с использованием колонки Acquity BEH C18, 1,7 мкм, 50 × 2,1 мм («Waters»), 0.5 мл/мин, при 35 °С с градиентом 5–100% CH_3CN в 20 мМ HCOOH за 4 мин.

Спектры MALDI-TOF MS получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре «Ultrafle Xtreme Bruker Daltonics» («Bruker», Германия), оснащённом УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

Спектры ЯМР соединений регистрировали на спектрометре «Bruker Avance» («Bruker»), рабочие частоты составляли 600 МГц для ^1H и 151 МГц – для ^{13}C при 298 К в ДМСО- d_6 с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Отнесение сигналов ^1H и ^{13}C было осуществлено с использованием одномерных спектров ^1H и ^{13}C и двумерных ^1H - ^1H ROESY (время смешивания 320 мс), ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^{13}C - ^1H HSQC и ^{13}C - ^1H HMBSC. Спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения NMRPipe [46] с использованием стандартного протокола, включающего взвешивающую функцию Лоренца–Гаусса, метод прямого-обратного линейного предсказания и метод полиномиальной коррекции базовой линии. Спектры одномерного ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы Mnova («Mestrelab Research», Испания). Двумерные спектры анализировали с помощью программного обеспечения NMRFAM-Sparky [47].

Анизотропию флуоресценции измеряли при комнатной температуре с помощью планшетного мультиридера «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader» («Perkin Elmer», США) на 384-луночном планшете. Длина волны поглощения составляла 485 нм, испускания – 535 нм.

Дизайн молекул выполняли с помощью метода статического моделирования с использованием программного обеспечения Avogadro [48]

и PyMOL 2.6 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6 Schrödinger, LLC).

Синтез пептидных производных десмикозина. Синтез пептидов *Fmoc-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**1a**), *Fmoc-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**2a**), *Boc-Val-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**3a**) описан в «Приложении», схема синтеза пептидов представлена на рис. S1 в Приложении.

3,2',4'',4'''-О-тетраацетил-тилозин (5). TYL (**4**) (512 мг; 0,56 ммоль; 1 экв.) растворяли в пиридине (5 мл) и добавляли уксусный ангидрид (290 мкл; 3,1 ммоль; 5,5 экв.). Раствор перемешивали сутки при комнатной температуре. Пиридин удаляли на роторном вакуумном испарителе в смеси с бензолом. Продукт очищали на силикагеле в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 479 мг (79%; 0,44 ммоль); ТСХ: R_f 0,43 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{NO}_{21} + \text{H}]^+ - 1084,6$; найдено – 1084,6.

3,2',4''-О-триацетил-десмикозин (6). Ацетилированное производное тилозина (**5**) (359 мг; 0,33 ммоль; 1 экв.) растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и добавляли 5,92 мл 0,2 N HCl (3,6 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре несколько часов до достижения полного гидролиза, который контролировали по ТСХ в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. По окончании реакции смесь нейтрализовали с помощью 5%-ного раствора NaHCO_3 , экстрагировали хлороформом, промывали насыщенным раствором NaCl и сушили над б/в Na_2SO_4 . Очистку продукта проводили с использованием колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 236 мг (80%; 0,26 ммоль); ТСХ: R_f 0,29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); R_f 0,31 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 16/1/0,1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{NO}_{17} + \text{H}]^+ - 898,5$; найдено – 898,6.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]бутаноил)-десмикозин (7). Производное **6** (208 мг; 0,23 ммоль; 1 экв.) и Boc-GABA (94 мг; 0,46 ммоль; 2 экв.) растворяли в хлористом метиле (абс.) при 0 °C. Далее последовательно добавляли DCC (143 мг; 0,69 ммоль; 3 экв.) и DMAP (42 мг; 0,34 ммоль; 1,5 экв.). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на ночь. Растворитель удаляли на роторном вакуумном испарителе, образовавшийся осадок растворяли в ацетонитриле и отделяли от осадка дициклогексилмочевины фильтрованием. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 137 мг (57%; 0,13 ммоль); ТСХ: R_f 0,51 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_{20} + \text{H}]^+ -$

1083,6; найдено – 1083,6. ^1H ЯМР, COSY, TOCSY, ROESY, HMBC, HSQC (CDCl_3 ; 600 MHz) δ (ppm): 0,84 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, H17); 0,85–0,88 (m, 3H, H18); 1,04–1,07 (m, 3H, H6'); 1,10 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, H6''); 1,15 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H, H21); 1,36 (s, 9H, H4'h); 1,45–1,48 (m, 1H, H7^a); 1,50–1,57 (m, 3H, H4, H7^b, H16^a); 1,73–1,75 (m, 5H, H22, H4'c); 1,77–1,81 (m, 1H, H16^b); 1,85 (br d, $J = 3,8$ Hz, 1H, H2^a); 1,98 (s, 3H, H2'b); 2,04 (s, 3H, H4''b); 2,08 (s, 3H, H3b); 2,25–2,28 (m, 8H, H4'b, H3'a); 2,31–2,40 (m, 1H, H6); 2,40–2,56 (m, 3H, H8, H19^a, H2^b); 2,64–2,73 (m, 2H, H19^b, H3'); 2,94–2,99 (m, 2H, H14, H2''); 3,07–3,11 (m, 2H, H4d); 3,30–3,36 (m, 1H, H5'); 3,38 (s, 3H, H2''a); 3,45 (s, 3H, H3''a); 3,46–3,52 (m, 1H, H23^a); 3,55 (br d, $J = 10,1$ Hz, 1H, H5); 3,74 (br d, $J = 10,1$ Hz, 1H, H3); 3,80–3,86 (m, 2H, H3'', H5''); 3,90 (dd, $J = 9,7, 4,5$ Hz, 1H, H23^b); 4,24 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H1'); 4,37 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H4''); 4,55 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H1''); 4,64 (td, $J = 9,9, 3,7$ Hz, 1H, H4'); 4,70–4,76 (m, 1H, H15); 4,81–4,86 (m, 2H, H2', H4'e); 5,84 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H, H13); 6,23 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, H10); 7,32 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, H11); 9,61 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H20). ^{13}C ЯМР, HMBC, HSQC (CDCl_3 , 151 MHz) δ (ppm): 7,55 (C18); 8,41 (C17); 12,12 (C22); 16,35 (C6''); 16,36 (C6'); 16,42 (C21); 19,65 (C3b); 19,87 (C4''b); 20,29 (C2'b); 24,13 (C4'c); 24,61 (C16); 27,29 (3C, C4'h); 30,81 (C4'b); 30,96 (C7); 31,53 (C6); 38,25 (C2); 38,70 (C4'd); 39,72 (C4); 40,30 (2C, C3'a); 42,71 (C19); 43,27 (C14); 44,01 (C8); 58,39 (C2''a); 60,48 (C3'a); 65,69 (C3); 66,07 (C3''); 66,30 (C5''); 68,72 (C23); 69,42 (C2'); 69,99 (C5'); 70,29 (C4'); 73,67 (C4''); 74,02 (C15); 76,64 (C3''); 78,07 (C4'g); 79,52 (C2''); 79,69 (C5); 100,05 (C1''); 100,73 (C1'); 117,55 (C10); 133,85 (C12); 140,45 (C13); 146,95 (C11); 154,84 (C4'f); 168,06 (C2'a); 169,02 (C4'a); 169,84 (C3a); 171,02 (C4'a); 172,62 (C1); 201,54 (C20); 202,31 (C9).

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(4-аминобутаноил)-десмикозин (8). Соединение **7** (76 мг; 0,070 ммоль) растворяли в 3 мл 50%-ной TFA в CH_2Cl_2 при 0 °C и перемешивали в течение 1 ч. Летучие компоненты смеси удаляли на роторном вакуумном испарителе, остаток растворяли в небольшом объеме CH_2Cl_2 и осаждали диэтиловым эфиром, осадок центрифугировали, переосаждали продукт таким образом ещё несколько раз, сушили на воздухе. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход: 16 мг (23%; 0,016 ммоль); ТСХ: R_f 0,17 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{18} + \text{H}]^+ - 983,5$; найдено – 983,7.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[[N(2-флуоретилметоксикарбонил)-N(6-трет-бутоксикарбонил)-L-лизил]-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9a). Защищённый тетрапептид **1a** (54 мг; 61 мкмоль; 1,5 экв.) растворяли в DMF и добав-

ляли HVTU (31 мг; 82 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (21 мкл; 123 мкмоль; 3 экв.) и перемешивали в течение 15 мин. Далее в смесь добавляли производное **8** (40 мг; 41 мкмоль; 1 экв.). Затем по истечении 20 мин добавляли 20% DIPEA от исходного количества (4,2 мкл). Смесь оставляли перемешиваться на ночь, затем разбавляли водой в несколько раз и экстрагировали смесью гексан/этилацетат = (1/1). Органическую фазу последовательно промывали небольшими объёмами 0,1 М HCl, воды и 5%-ного раствора NaHCO₃. Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 23 мг (29%; 12 мкмоль); ТСХ: R_f 0,42 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₉₈H₁₃₉N₇O₂₇ + H]⁺ – 1847,0; найдено – 1846,8.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[(N-флуоренилметоксикарбонил)-О-трет-бутил-L-аспартил]-(N6-трет-бутоксикарбонил-L-лизил)-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9b). Получали аналогично **9a**, исходя из 41 мг (39 мкмоль; 1,3 экв.) защищённого пентапептида **2a**, HVTU (23 мг; 60 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (19 мкл; 107 мкмоль; 3,6 экв.), производного **8** (29 мг; 30 мкмоль; 1 экв.). Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 9 мг (15%; 4,5 мкмоль); ТСХ: R_f 0,35 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₁₀₆H₁₅₂N₈O₃₀ + H]⁺ – 2018,1; найдено – 2017,8.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[(N-трет-бутил-оксикарбонил-L-валил)-(О-трет-бутил-L-аспартил)-(N6-трет-бутоксикарбонил-L-лизил)-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9c). Получали аналогично **9a**, исходя из 80 мг защищённого гексапептида (**3a**) (78 мкмоль; 1,5 экв.), HVTU (39 мг; 103 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (32 мкл; 185 мкмоль; 3,6 экв.), производного **8** (51 мг; 52 мкмоль; 1 экв.). Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 30 мг (29%; 15 мкмоль); ТСХ: R_f 0,3 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₁₀₁H₁₅₉N₉O₃₁ + H]⁺ – 1995,1; найдено – 1994,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (1). Соединение **9a** массой 16 мг (8,7 мкмоль) растворяли в 500 мкл 20%-ного раствора пиперидина (Pip) в DMF. Смесь перемешивали в течение 40 мин при комнатной температуре. Далее продукт осаждали из раствора петролейным эфиром, осадок отделяли центрифугированием, и вещество переосаждали таким образом несколько раз. Полученный твёрдый остаток добавляли к 500 мкл 50%-ной TFA в хлори-

стом метиле при 0 °С, и смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Далее TFA и растворитель удаляли в вакууме. Получившийся сухой остаток растворяли в небольшом количестве хлористого метилена и осаждали диэтиловым эфиром, осадок отделяли центрифугированием, затем полученный продукт переосаждали таким образом несколько раз. Выход: 1 мг (8%; 0,68 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₇₄H₁₁₃N₇O₂₃ + H]⁺ – 1468,8; найдено – 1468,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-аспартил-L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (2) получали аналогично **1** исходя из **9b** (9 мг; 4,5 мкмоль). Выход: 1 мг (14%; 0,63 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₇₈H₁₁₈N₈O₂₆ + H]⁺ – 1583,8; найдено – 1583,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-валил-L-аспартил-L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (3). Соединение **9c** (30 мг; 15 мкмоль) растворяли в 500 мкл 50%-ной TFA в хлористом метиле при 0 °С и перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Далее TFA и растворитель удаляли в вакууме. Получившийся сухой остаток растворяли в небольшом количестве хлористого метилена и осаждали диэтиловым эфиром, осадок отделяли центрифугированием, затем полученный продукт переосаждали несколько раз. Выход: 5 мг (20%; 3,0 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₈₃H₁₂₇N₉O₂₇ + H]⁺ – 1682,9; найдено – 1683,0.

Изучение связывания аналогов десмикозина с рибосомами *E. coli*. Аффинность соединений к 70S-рибосомам *E. coli* (штамм MRE-600 (70S-рибосомы *E. coli* были любезно предоставлены лабораторией А.Л. Коневеги)) определяли методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина – BODIPY-ERY, как было описано ранее [49, 50]. Концентрации исследуемых веществ варьировались от 1 нМ до 10 мкМ. Концентрация 70S-рибосом *E. coli* и BODIPY-ERY составляла 50 и 16 нМ соответственно. Смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем измеряли уровень анизотропии флуоресценции. Для каждого соединения было выполнено минимум 2 повтора. Расчёт эффективных констант диссоциации был проведён на основе стандартной модели, которая описывает равновесное конкурентное связывание двух лигандов в одном сайте [51].

In vitro трансляция. Ингибирование синтеза белка в бесклеточной системе проводили на основе системы трансляции люциферазы светлячка, как было описано ранее [52] –

T7-транскрибируемая мРНК (*Fluc*) люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) транслировалась в бесклеточной S30-системе *E. coli* согласно известной методике [53]. Концентрация исследуемых соединений составляла 20 мкМ, уровень трансляции *in vitro* после инкубирования измеряли с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System («Promega», США) на планшетном мультиридере «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader».

Тестирование на антибиотическую активность проводили на следующих штаммах: *E. coli* JW5503 *ΔtolC*, модифицированном репортёрной последовательностью *pDualrep2* [54, 55], в котором остановка процесса трансляции приводит к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S; *E. coli* JW5503 *ΔtolC KanR*, резистентный к канамицину; *E. coli* JW5503 *ΔtolC*, модифицированном плазмидой *pKH80* [56], обеспечивающей устойчивость к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, трансформированном плазмидой *pAM552* [57]; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, модифицированном *pAM552* с заменой A2058G в 23S рРНК; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, модифицированном *pAM552* с заменой A2059G в 23S рРНК (плазмиды *pAM552*, содержащие замены A2058G и A2059G, были любезно предоставлены А.С. Манькиным (Иллинойсский университет в Чикаго)). Тестируемые соединения в количестве 10 нмоль, а также эритромицин в количестве 6,8 нмоль наносили на чашки с агаром, которые уже содержали соответствующий штамм. Чашки инкубировали при 37 °С в течение ночи, уровень экспрессии флуоресцентных белков в штамме, содержащем плазмиду *pDualrep2*, и зоны ингибирования бактериального роста в остальных штаммах оценивали с помощью системы визуализации ChemiDoc («Bio-Rad», США).

Измерение минимальной ингибирующей концентрации проводили на следующих штаммах: *E. coli* JW5503 *ΔtolC KanR*, *E. coli* JW5503 *ΔtolC pKH80*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552 A2058G*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552 A2059G*. Для проведения эксперимента 96-луночный планшет заполняли суспензией клеток, полученной путём разбавления ночной культуры в 200 раз в среде LB («Amresco», США). В ячейки первого ряда добавляли 4 мкл тестируемого соединения (в концентрации 4–68 мМ в ДМСО), после чего готовили серию двукратных разведений в последующих рядах до десятого. После этого планшеты инкубировали при 37 °С в течение ночи с аэрацией 200 об./мин. О концентрации клеток судили по значению оптической

плотности при 600 нм. Измерение проводили на планшетном мультиридере «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader». В качестве минимальной ингибирующей концентрации (МИК) принимали наименьшую концентрацию, при которой исследуемое вещество полностью подавляло рост бактерий.

Молекулярная динамика*. Моделируемая система. Структура рибосомы *E. coli* была получена исходя из данных рентгеноструктурного анализа структуры с разрешением 3,1 Å (PDB ID: 4V7U) [58] с добавлением в 23S рРНК модифицированных оснований в соответствии со сведениями из банка данных [59]. Положения модифицированных оснований были оптимизированы минимизацией энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно с ограниченным использованием памяти [60], за которой следовал расчёт короткой молекулярной динамики. При этом все немодифицированные основания были полностью зафиксированы, тогда как модифицированные основания, ионы и вода двигались, а эритромицин, содержащийся в исходной рентгеновской структуре, был изъят. После оптимизации были выделены все остатки, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь РТ и ПТЦ, так что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликата. Подобный подход использовался в работах ранее [61, 62]. На полученное выделение накладывали структуру рибосомы *Haloarcula marismortui*, имеющую разрешение 3,0 Å (PDB ID: 1K9M) [28], устанавливая в этот фрагмент рибосомы TYL. Затем остаток микарозы удаляли, а конформацию остатка мицинозы в сайте связывания оптимизировали докинггом, применяя пакет rDock [63], сохраняя при этом положение, ориентацию и конформацию лактонного кольца и остатка микаминозы неизменными. При моделировании комплекса онкоцина с рибосомой *E. coli* на то же выделение накладывали структуру комплекса онкоцина I12 (ONC, VDKPPYLPRPRPPRrIYNr-NH₂) с рибосомой *Thermus thermophilus*, имеющую разрешение 2,9 Å (PDB ID: 4Z8C) [43], устанавливая в этот фрагмент ONC.

При моделировании конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (1–3) исходные состояния структуры их комплексов с рибосомой *E. coli* получали, накладывая на описанную выше

* Детализированное описание методов молекулярно-динамического моделирования приведено в Приложении.

структуру комплекса десмикозина *N*-концевые пептиды онкоцина Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶ или Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶ из структуры комплекса ONC с рибосомой *T. thermophilus*. При этом остаток 4-аминобутановой кислоты, соединяющий десмикозиную и онкоциновую части конъюгатов, а также ацетильные группы в 3,2',4"-положениях были смоделированы с помощью программы PyMOL.

В ходе молекулярно-динамического моделирования этилальдегидная группа каждого рассматриваемого производного десмикозина была ковалентно связана с экзоциклической аминогруппой основания A2062 с образованием карбиноламина. При изучении эффекта мутации A2059G в построенных таким образом структурах заменялось соответствующее азотистое основание.

Общие условия моделирования. Все расчёты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводили с использованием пакета GROMACS версия 5.1.4 [64, 65]. Канонические и модифицированные аминокислотные и нуклеотидные остатки моделировали с использованием силового поля Amber14sb [66], а DES и его производные – с помощью силового поля GAFF [67]. При этом оптимизированные трёхмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуемых остатков и соединений получали квантово-химическими расчётами методом Хартри–Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычисляли в модели RESP [68]. Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 25 пс. Для ограничения длин связей с атомами водорода использовали алгоритм LINCS [69]. Моделирование выполнялось при температуре 310 К с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [70] и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [71] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [72] с шагом сетки 0,125 нм и четвёртым порядком интерполяции. Моделируемые системы центрировали в тетрагональной ячейке размером 9,5 × 9,5 × 9,4 нм, заполненной молекулами воды TIP4P_{EW} [73] так, что грани системы были покрыты слоем растворителя в 0,9 нм. Остаточный отрицательный заряд системы был компенсирован ионами калия с оптимизированными параметрами [74], причём добавляемые ионы располагались вблизи отрицатель-

но заряженных групп [75] (программный код был любезно предоставлен А.О. Залевским). Кроме того, часть молекул воды была случайным образом заменена ионами калия, магния и хлорид-анионами с тем, чтобы препятствовать вымыванию противоионов магния и калия в водную фазу; при этом в водной фазе устанавливались концентрации 7 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Остатки, хотя бы один атом которых находится в пределах 0,1 нм от грани моделируемого участка рибосомы, были позиционно ограничены, при этом все остальные могли свободно двигаться.

При моделировании структуры комплекса соединения 3 с рибосомой *E. coli* выполнялись расчёты уравновешенной метадинамики [76] с обменом реплик [77] для введённых ацетильных групп. Расчёт выполняли при помощи пакета PLUMED версия 2.3 [78], работающего в комплексе с пакетом GROMACS версия 5.1.4. Взвешивающий потенциал подстраивали, добавляя к нему одно- и двумерные гауссовы функции высотой 3 кДж/моль и шириной 10 градусов с периодичностью 2500 шагов (5 пс) до тех пор, пока высота гауссиан не достигла порядка 0,1 кДж/моль. Взвешивающий коэффициент составлял 8, использовалось 6 реплик. В ходе этих расчётов подвижность атомов сахарофосфатного остова 23S рРНК была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 1000 кДж/нм², подвижность атомов пептидной части конъюгата была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 10 кДж/нм², а подвижность десмикозиновой части конъюгата, воды, ионов, а также аминокислотных остатков белков рибосомы и азотистых оснований не ограничивалась.

Методы анализа траекторий. Анализ местонахождения и частоты встречаемости водородных связей и стэкинг-взаимодействий производили по описанной ранее методике [79]. Частота встречаемости водородной связи или стэкинг-взаимодействия рассчитывалась как отношение количества кадров траектории, в которых обнаружено соответствующее взаимодействие, к общему количеству кадров в траектории. Кластеризацию проводили методом GROMOS [80]. Также вычисляли значения среднеквадратичной флуктуации атомов (RMSF). RMSF *i*-атома с координатой \mathbf{r}_i на протяжении *T* кадров траектории рассчитывали по формуле:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{(\mathbf{r}_i - \langle \mathbf{r}_i \rangle)^2}{T}}$$

При анализе траекторий значения RMSF атомов усредняли по рассматриваемым молекулам.

Визуализацию полученных данных проводили с помощью программного обеспечения PyMOL 2.6 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6 Schrödinger, LLC).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Статическое моделирование. С помощью статического моделирования был выполнен дизайн конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина, целью которого было определение оптимальной аминокислотной последовательности в структуре онкоцина (рис. 1, а), с которой может быть осуществлена конъюгация, а также нахождение наиболее подходящего линкера для соединения макролидной и пептидной частей молекулы. Для этого использовали кристаллические структуры TYL в комплексе с рибосомой *H. marismortui* (PDB ID: 1K9M) [28] и ONC в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [43], полученные методом рентгеноструктурного анализа (рис. 1, б–г). Наложение структур комплексов бактери-

альных рибосом с TYL и ONC (рис. 1, г) показало, что 4'-О-атом микаминозы TYL находится на расстоянии 5,5 Å от атома азота амидной группы Tyr⁶ ONC. Поэтому в качестве фрагментов онкоцина для присоединения к DES были выбраны тетра-(Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶), пента-(Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶) и гексапептид (Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶). Подходящим по длине линкером для соединения 4'-ОН-группы микаминозы и карбоксильной группы Tyr⁶ оказался остаток 4-аминобутановой кислоты (рис. 1, д).

Синтез. Синтез сконструированных в соответствии с данными статического моделирования конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (1–3) был осуществлён по схеме (рис. 2). На первом этапе проводили ацетилирование TYL с последующим кислотным гидролизом с получением производного десмикозина 6, в структуре которого все гидроксильные группы, кроме 4'-ОН, были ацетилированы. Производное модифицировали с помощью Вос-4-аминобутановой кислоты по 4'-ОН-группе, получая таким обра-

а **ONC 112: H-Val-Asp-Lys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Arg-D-Arg-Ile-Tyr-Asn-D-Arg-NH₂**

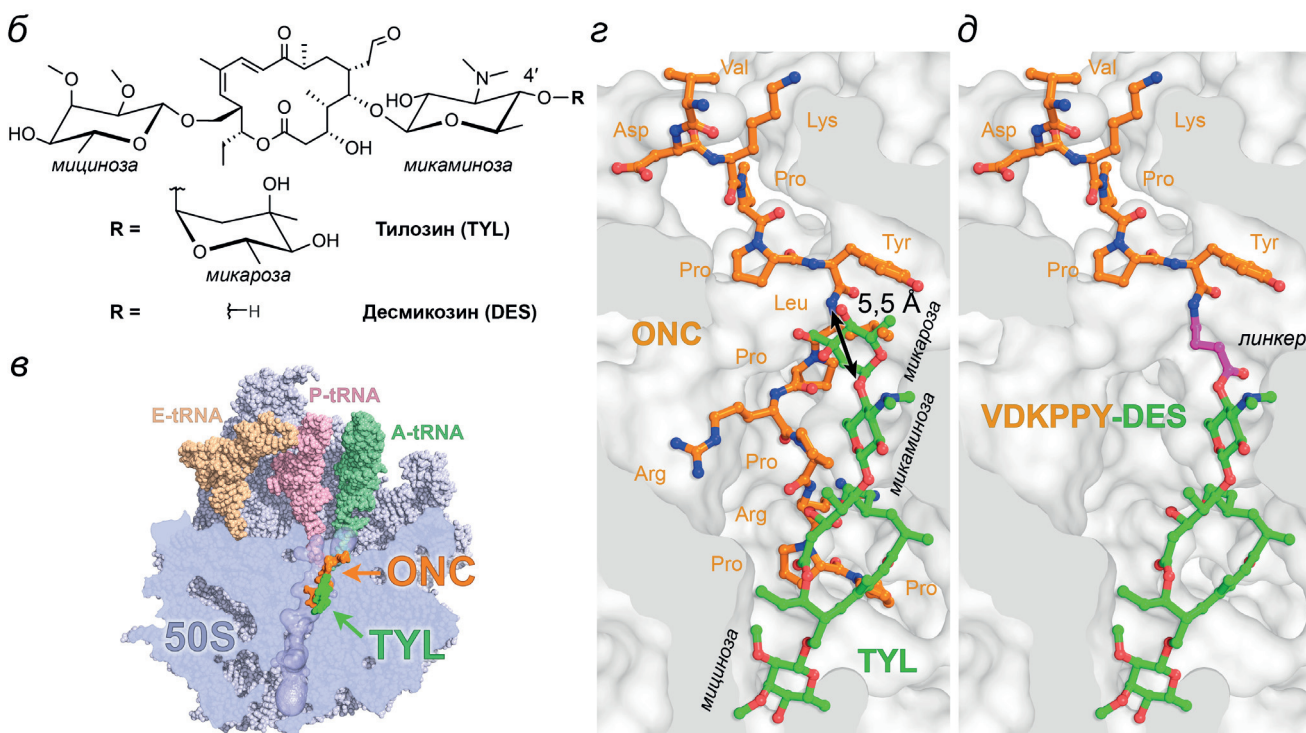


Рис. 1. Структуры и комплексы с рибосомой онкоцина 112 (ONC), тилозина (TYL), десмикозина (DES) и их производного VDKPPY-DES. а – Аминокислотная последовательность антимикробного пептида ONC. Оранжевым выделена последовательность, предложенная для модификации DES. б – Структура антибиотиков TYL и DES. в – Схематичное отображение сайтов связывания TYL (зелёный) и ONC (оранжевый) с 50S-субъединицей рибосомы *T. thermophilus*. г – Наложение структуры комплекса TYL (зелёный) с рибосомой *H. marismortui* (PDB ID: 1K9M) и структуры комплекса ONC (оранжевый) с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C). Показано расстояние между атомом азота амидной группы Tyr⁶ онкоцина и 4'-кислородом микаминозы. д – Модель конъюгата десмикозина (зелёный) с фрагментом онкоцина^{1–6} (Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶, оранжевый), соединённые через остаток 4-аминобутановой кислоты (розовый), в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C)

зом соединение **7**, после чего деблокировали аминогруппу. К полученному производному десмикозина (**8**) присоединяли *N*-концевые пептидные фрагменты онкоцина (**1a–3a**), защищённые флуоренилметилоксикарбонильной группой (Fmoc-группой) по α -аминофункции, Вос-группой – по ϵ -аминогруппе лизина и *t*Bu-группами – по боковым функциональным группам аспарагиновой кислоты и тирозина. Пептиды **1a–3a** были предварительно синтезированы методом твёрдофазного синтеза на 2-хлоритрильном полимере; для отщепления

пептидов от носителя с сохранением защитных групп применяли HFIP (рис. S1 в Приложении). Конденсацию пептидов **1a–3a** с аминогруппой производного десмикозина **8** осуществляли с помощью HBTU. Удаление защитных групп пептидных фрагментов соединений **9a–9c** приводило к получению конъюгатов 3,2',4''-триацетилдесмикозина с фрагментами онкоцина Lys³–Tyr⁶ (**1**), Asp²–Tyr⁶ (**2**) и Val¹–Tyr⁶ (**3**).

Очистка промежуточных и целевых соединений проводилась с помощью метода колоночной хроматографии на силикагеле. Соединения

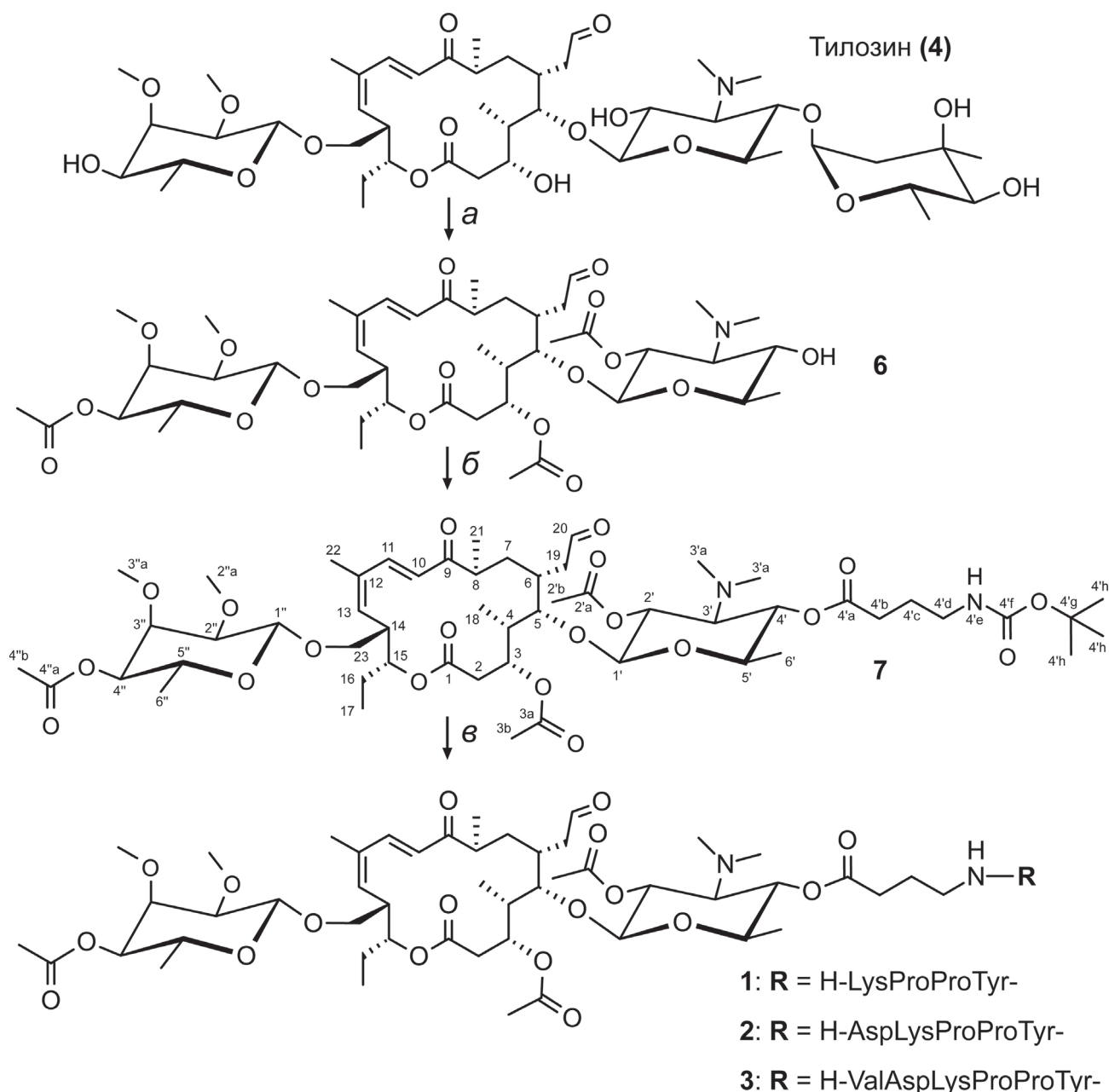


Рис. 2. Схема синтеза конъюгатов десмикозина с фрагментами пептида онкоцина. *a* – 1) Ac₂O, Py (**5**), 2) 0,2 М HCl (**6**); *б* – Вос-GABA, DMAP, DCC (**7**); *в* – 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Fmoc-Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**1a**), HBTU, DIPEA (**9a**), 3) 20% Pip/DMF, 4) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**1**); 2) 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Fmoc-Asp(*t*Bu)Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**2a**), HBTU, DIPEA (**9b**), 3) 20% Pip/DMF, 4) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**2**); 3) 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Вос-ValAsp(*t*Bu)Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**3a**), HBTU, DIPEA (**9c**), 3) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**3**)

были охарактеризованы методами хроматографии и масс-спектрометрии. Положение заместителя по 4'-гидроксильной группе DES было доказано для промежуточного соединения 7 с помощью методов двумерного ЯМР: COSY, TOCSY, ROESY, ^{13}C -HMBC, ^{13}C -HSQC (рис. S2 в Приложении). Так, на спектре ^{13}C -HMBC наблюдается кросс-пик, соответствующий взаимодействию атома H4' микаминозы с углеродом C4'a карбонильной группы Вос-GABA. Эти атомы, в свою очередь, однозначно идентифицируются по наличию характеристичных корреляций в спектрах ^{13}C -HMBC и ROESY.

Изучение связывания производных десмикозина с рибосомами *E. coli*. Способность соединений связываться с бактериальными рибосомами была оценена методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина – BODIPY-ERY, как было описано ранее [49, 50]. С помощью данного метода удалось определить эффективные константы диссоциации (K_D) комплексов полученных соединений с рибосомами *E. coli* (рис. 3, а). Оказалось, что ацетилирование десмикозина хотя и снижает эффективность связывания с РТ, однако этот эффект выражен слабо – значение K_D для триацетилдесмикозина, соединение 6 ($3,9 \pm 0,6$ нМ) мало отличается от такового для исходного антибиотика DES ($2,7 \pm 0,6$ нМ). В то же время аффинность к рибосоме производных десмикозина, содержащих фрагменты онкоцина, существенно снизилась. Несмотря на то что значения K_D для соединений 1 (80 ± 20 нМ), 2 (170 ± 30 нМ) и 3 (310 ± 60 нМ) лежат в наномолярном диа-

пазоне, что характерно как для класса макролидов [49], так и для взаимодействующих с рибосомой пролин-богатых антимикробных пептидов (ПБАМП), в том числе ONC ($6\text{--}93$ нМ) [81–84], они всё же на несколько порядков превышают значение K_D для DES. При этом наблюдается уменьшение степени сродства полученных конъюгатов к РТ с ростом длины пептидного фрагмента. Тем не менее аффинность производных десмикозина, содержащих фрагменты онкоцина, к бактериальной рибосоме превышает таковую для многих антибиотиков, связывающихся в ПТЦ и РТ [85], в том числе некоторых ПБАМП [81–84], эффективно подавляющих рост бактерий, и значительно превосходит аффинность фрагмента ONC^{1–9} ($K_D = 2,8 \pm 4,3$ мкМ) [84].

In vitro трансляция. Поскольку известно, что для многих макролидов ингибирование пептидил-трансферазной реакции происходит в процессе трансляции с участием синтезирующейся полипептидной цепи [86–88] и может не коррелировать с их аффинностью к «пустой» рибосоме [9, 10], следующим этапом была оценка эффективности ингибирования полученными соединениями 1–3 трансляции *in vitro*. Измерение ингибирующей активности проводили в бесклеточной системе трансляции мРНК люциферазы светлячка (*Fluc*). Все конъюгаты десмикозина с фрагментами онкоцина ингибируют синтез белка (рис. 3, б). Значительный уровень подавления трансляции, близкий к исходному антибиотику DES, продемонстрировало соединение 1. Несмотря на то что среди полученных конъюгатов это сое-

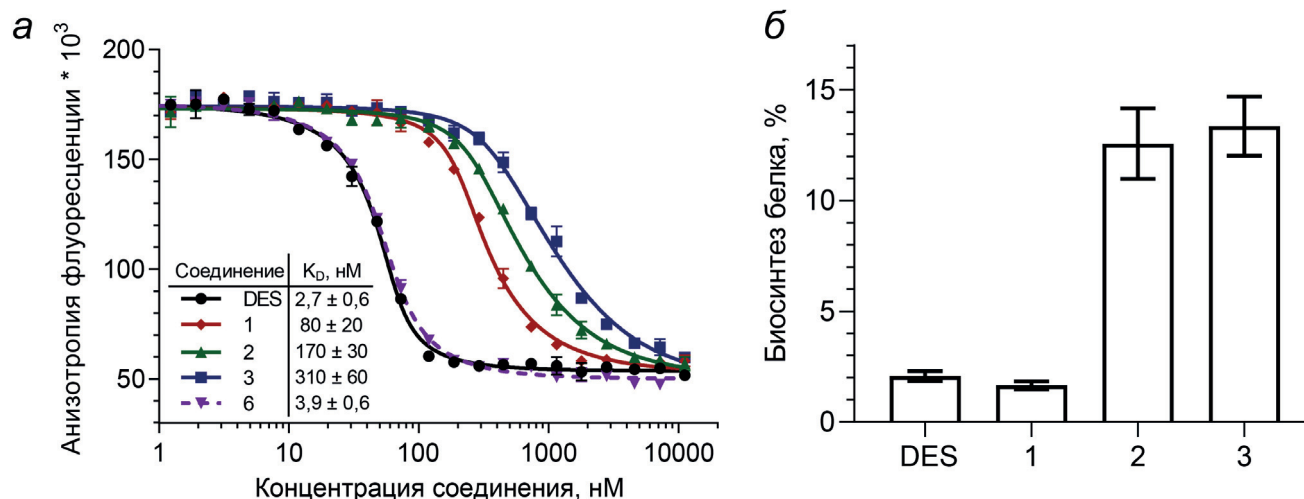


Рис. 3. Аффинность к рибосоме и ингибирующая активность конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина 1–3. *а* – Конкурентное связывание BODIPY-ERY и соединений 1–3 с 70S-рибосомами *E. coli*. Для каждой точки приведено среднее значение со стандартным отклонением. Эффективные константы диссоциации (K_D) комплексов исследуемых соединений с рибосомами представлены как средние значения с доверительным интервалом ($\alpha = 0,05$). *б* – Способность конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro*. Приведены средние значения со стандартным отклонением

динение также имело наибольшую аффинность к РТ (рис. 3, *a*), корреляции между ингибирующей активностью и сродством к рибосоме для всего ряда производных не наблюдается.

Антибактериальная активность. Способность синтезированных конъюгатов 1–3 к подавлению роста бактерий была проверена на ряде штаммов *E. coli*, в том числе резистентных к макролидам (рис. 4 и рис. S3 в Приложении).

Штамм *E. coli* JW5503 *ΔtolC pDualrep2* содержит двойную репортёрную систему с плазмидой *pDualrep2*. Действие соединений, вызывающих остановку рибосомы, приводит в такой системе к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S, что позволяет быстро и точно определить механизм действия вещества [54]. Результаты эксперимента (рис. 4, *a*) показали, что соединения в разной степени проявляют антимикробную активность, причём их действие на бактерии связано с подавлением бактериальной трансляции, о чём свидетельствует появление красного окрашивания вокруг зон ингибирования штамма JW5503 *pDualrep2*, содержащего репортёрную систему. Активность триацетилизованного производного 6 в отношении этого штамма близка к исходному антибиотику DES, а антибактериальное действие конъюгатов 1–3 несколько снижено.

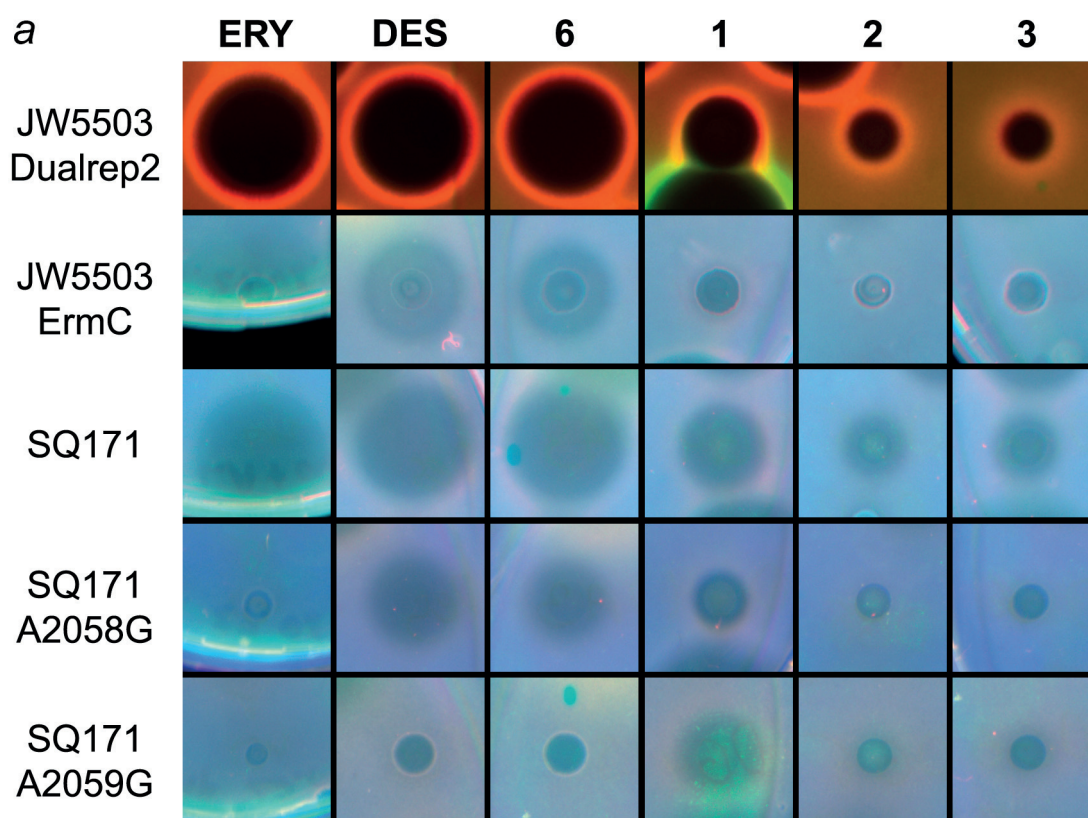
Устойчивость штамма *E. coli* JW5503 *ΔtolC pKH80* к макролидам возникает за счёт трансляции метилтрансферазы ErmC, которая метилирует A2058 23S рРНК бактерий, что приводит к понижению эффективности связывания макролидов и рибосомы [89]. Тестирование конъюгатов 1–3 на этом резистентном штамме (рис. 4, *a* и *b*) показало, что все соединения ингибируют его рост. Несмотря на то что по действию на немодифицированный штамм производное 1 уступает DES и ERY, на резистентном штамме, содержащем метилтрансферазу ErmC, оно проявляет активность, в отличие от полностью неактивного ERY, и эта активность оказывается более значительной, чем в случае DES (рис. 4, *b*). Несколько меньшая активность отмечена для гексапептидного производного 3. Следует отметить, что триацетилованный аналог десмикозина 6 проявил слабое антибактериальное действие в отношении ErmC-устойчивого штамма (рис. 4, *b*).

Устойчивость штаммов *E. coli* SQ171 *ΔtolC* A2058G и *E. coli* SQ171 *ΔtolC* A2059G к макролидам обеспечена за счёт соответствующих замен нуклеотидов в консервативном участке 23S рРНК. A2058 и A2059 являются ключевыми нуклеотидами во взаимодействии макролидов с рибосомой, замена которых на G приводит к значительному снижению аффинности ан-

тибиотиков к рибосоме и потере ими антибактериальной активности [90, 91]. Мутация A2058G – одна из наиболее частых в клинически выделенных резистентных к макролидам штаммах. ERY практически не проявляет антибактериального действия по отношению к данным штаммам, в то время как активность DES и его ацетилизованного аналога 6 значительно снижена, особенно в случае мутации A2059G (рис. 4, *a* и табл. S1 в Приложении). В то же время производное 1 оказалось активным как в отношении штамма с заменой A2058G, так и в случае мутации A2059G (рис. 4, *a*). Этот факт может свидетельствовать об ином, уникальном по сравнению с исходным антибиотиком, паттерне взаимодействий полученной молекулы с элементами РТ.

Молекулярная динамика. Методами молекулярной динамики были исследованы комплексы конъюгатов десмикозина с N-концевыми пептидными фрагментами онкоцина (1 и 3) с рибосомами *E. coli* дикого типа, а также содержащими мутацию A2059G в сравнении с аналогичными комплексами DES и ONC (таблица и рис. 5). Производные десмикозина были ковалентно связаны с экзоциклической аминогруппой основания A2062 через карбиноламинную группу (рис. S4 в Приложении), как это было показано для TYL [28]. Количество и протяжённость траекторий приведены в табл. S2 в Приложении. В результате было выявлено, что DES в комплексе с рибосомой *E. coli*, подобно другим 16-членным макролидам [79], удерживается в сайте связывания прочными водородными связями между гидроксильными группами мицинозы и нуклеотидными остатками G748 и A751 и между 2'-гидроксильной группой микаминозы и остатком A2058. При введении мутации A2059G DES почти полностью теряет водородные связи с мицинозой, а встречаемость водородной связи 2'-гидроксильной группы микаминозы с A2058 уменьшается более чем вдвое. При этом водородная связь, образованная протонированной 3'-аминогруппой, переключается с 4'-гидроксильной группы остатка G2505 на N7 его гетероциклического основания. Причиной служит возникающее стерическое противоречие между остатком микаминозы и экзоциклической аминогруппой G2059, вследствие которого DES поворачивается в сайте связывания, разрывая водородные связи с мицинозой (рис. S5 в Приложении и таблица).

При введении в структуру конъюгатов ацетильных групп по 4'-гидроксильной группе остатка мицинозы, 2'-гидроксильной группе остатка микаминозы и 3-гидроксильной груп-



б

Штамм	МИК (мкМ)				
	ERY	DES	6	1	3
JW5503	4	12	25	37	41
JW5503 ErmC	>1360	23	>200	19	83

Рис. 4. Тестирование конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина на антибиотическую активность. *а* – Зоны ингибирования исследуемыми соединениями роста различных штаммов бактерий *E. coli*. JW5503 *pDualrep2* – штамм *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, модифицированный репортёрной системой *pDualrep2*, красное свечение вокруг зон ингибирования свидетельствует об аресте трансляции; JW5503 ErmC – штамм *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, трансформированный *pKH80* (резистентный к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC); SQ171 – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552*; SQ171 A2058G – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552* с заменой A2058G в 23S рРНК; SQ171 A2059G – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552* с заменой A2059G в 23S рРНК. DES, а также соединения **1–3** и **6** наносили в количестве 10 нмоль, ERY – в количестве 6,8 нмоль. Полная версия отсканированных чашек представлена на рис. S3 в Приложении. *б* – Значения МИК, полученные для штаммов JW5503 (*E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ *KanR*) и JW5503 ErmC (*E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ *pKH80*, резистентный к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC)

пе тилонолида в комплексах конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* возникают стерические противоречия между ацетильными группами и остатками 23S рРНК при связывании десмикозиновой части конъюгатов в MBS, соответствующем рентгеноструктурным данным [28]. Поэтому мы методами молекулярно-динамического моделирования нашли такие конформации конъюгатов (**1** и **3**), которые обеспечивали бы их стабильное взаимодействие с MBS при условии возможности образования кова-

лентной связи с основанием A2062, наблюдаемой для TYL [28] (рис. 5, *а–г*).

Для конъюгатов **1** и **3**, ацелированных по 3-, 2'- и 4"-гидроксильным группам, не сохраняются водородные связи DES, в образовании которых участвовали соответствующие гидроксильные группы (таблица и табл. S3–S5 в Приложении). Кроме того, как указывалось выше, введённые ацетильные группы создают стерические противоречия, приводящие к изменению положения десмикозинового

Встречаемость водородных связей, образованных DES, ONC и их фрагментами в составе конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми пептидами онкоцина в комплексах с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G

Донор	Акцептор	DES WT	DES A2059G	ONC WT	ONC A2059G	1 WT	1 A2059G	3 WT	3 A2059G
Фрагмент десмикозина									
Мициноза/O ₄ –H	A751/O ₂	74	2	–	–	–	–	–	–
Мициноза/O ₄ –H	G748/O ⁶	88	–	–	–	–	–	–	–
Микаминоза/N ₃ –H	G2505/N ⁷	–	60	–	–	–	–	–	–
Микаминоза/N ₃ –H	G2505/O ₄	73	2	–	–	–	1	–	3
Микаминоза/O ₂ –H	A2058/N ¹	94	35	–	–	–	–	–	–
A752/N ⁶ –H	Мициноза/O ₉ *	–	–	–	–	–	18	–	35
G748/N ¹ –H	Мициноза/O ₃ *	96	4	–	–	1	4	–	–
G748/N ¹ –H	Мициноза/O ₄ *	–	–	–	–	52	7	23	9
Фрагмент онкоцина									
Val ¹ /N–H	C2507/O ₂	–	–	–	2	–	–	82	53
Lys ³ /N _ε –H	C2452/O ₂	–	–	–	28	3	3	20	10
Lys ³ /N _ε –H	C2507/O _{фосфат}	–	–	–	–	95	96	89	89
Lys ³ /N _ε –H	C2573/O _{фосфат}	–	–	–	–	85	95	98	97
Tyr ⁶ /N–H	U2506/O ₂	–	–	82	–	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _δ –H	C2610/O _{фосфат}	–	–	9	28	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _ω –H	C2610/O ¹ _{фосфат}	–	–	7	32	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _ω –H	C2610/O ² _{фосфат}	–	–	14	50	–	–	–	–

Примечание. Таблица составлена по данным молекулярно-динамических расчётов. Встречаемость состояний дана в % от кадров траекторий. Нумерация атомов представлена в соответствии с рис. S4 в Приложении.

фрагмента конъюгата в комплексе с рибосомой по сравнению с исходным десмикозином. Тем не менее в смоделированных структурах комплексов конъюгатов **1** и **3** с рибосомой (рис. 5, *в*) имеется водородная связь между N¹–H основания G748 и сложноэфирным кислородом 4"-ацетокси-группы остатка мицинозы, эта связь более стабильна в комплексах, образованных конъюгатом **1** (таблица). Разрушение водородных связей, типичных для 16-членных макролидов, и одновременная стабилизация взаимодействий онкоциновой части конъюгатов с 23S рРНК приводят к смещению десмикозиновой части конъюгатов в сторону ПТЦ (рис. 5, *а*). В этой новой конформации соединений **1** и **3** их пептидные фрагменты образуют довольно стабильные водородные связи, но не характерные для исход-

ного пептида ONC (таблица и рис. S6 в Приложении).

Введение мутации A2059G приводит к некоторому ослаблению водородных связей онкоциновой части конъюгатов **1** и **3** и существенному ослаблению водородных связей ацетилированной мицинозы с основанием G748 (табл. S1 и S6 в Приложении и рис. 5, *б* и *г*). При этом конформация конъюгатов **1** и **3** меняется относительно дикого типа слабо, поскольку их связывание в целом зависит в первую очередь от связывания фрагментов онкоцина и во вторую очередь – от связывания ацетилированного остатка мицинозы. Ацетилированный остаток микаминозы обеспечивает лишь неспецифическое кулоновское притягивание к 23S рРНК, которое оказывается нечувствительным к виду пуринового основания нуклеотида 2059.

Проведённый анализ значений RMSF для DES, ONC, а также конъюгатов **1** и **3** показал, что замена остатка A2059 на G в MBS рибосомы приводит к росту значений RMSF для всех исследуемых соединений (рис. 6). Наиболее выраженный эффект наблюдается для DES – подвижность его атомов увеличивается в 2 раза при связывании с мутантной рибосомой, что согласуется с его низкой антибактериальной активностью на соответствующем резистентном штамме (рис. 4, а). Введение в структуру DES фрагментов онкоцина ожидаемо приводит к росту RMSF за счёт большей подвижности пептидной части молекулы. Влияние мутации A2059G на флуктуации атомов ONC, а также соединений **1** и **3** заметно слабее. По-видимому, компенсация потерянных водородных связей тилонолида за счёт остатков онкоцина приводит к стабилизации конформации антибиотиков в мутированном MBS, что проявляется в сохранении антибактериальной активности

конъюгатов **1** и **3** при переходе к резистентному штамму (рис. 4, а).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе осуществлён дизайн и синтез серии конъюгатов *N*-концевых фрагментов онкоцина (Val¹–Tyr⁶, Asp²–Tyr⁶, Lys⁴–Tyr⁶) и 3,2',4''-триацетилдесмикозина, в которых пептидные фрагменты присоединены по 4'-положению мицинозы через линкер на основе 4-аминобутановой кислоты (**1**–**3**). Конъюгаты представляли интерес как потенциальные антимикробные агенты, а также как лиганды, взаимодействующие с функционально важными центрами бактериальной рибосомы – MBS, с которым связывается десмикозин, и ПТЦ, с которым взаимодействуют *N*-концевые фрагменты онкоцина.

В синтезированных аналогах десмикозина по 3, 2' и 4''-гидроксилам макролида содержатся

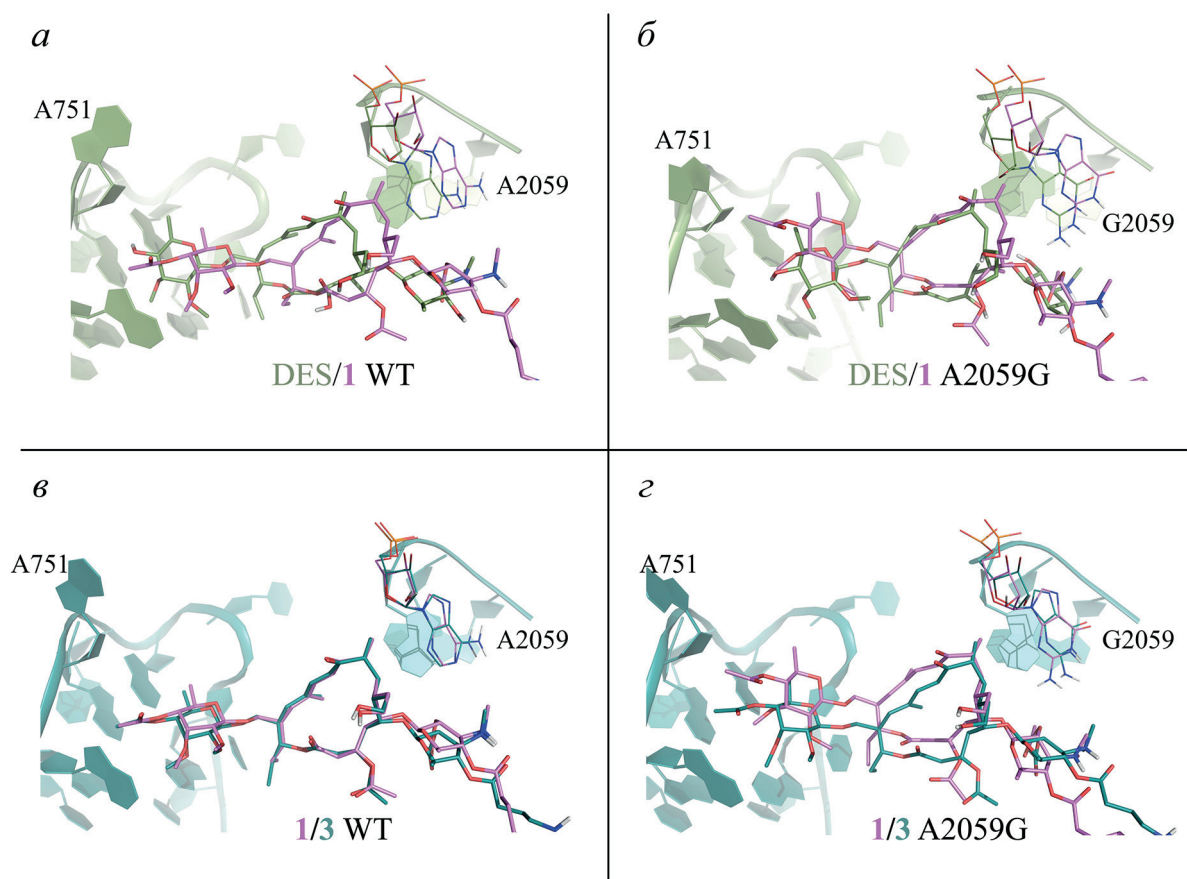


Рис. 5. Структуры соединений **1**, **3** и DES в комплексе с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G, полученные методом молекулярной динамики. Изображены только десмикозиновые части молекул. Альдегидная группа в положении 20 тилонолида показана в форме карбиноламина, образованного с участием экзотической аминогруппы основания A2062 (само основание A2062 на рисунке не показано). *а* – Наложение структуры DES (зелёный) и соединения **1** (фиолетовый) в комплексе с рибосомой дикого типа. *б* – Наложение структуры DES (зелёный) и соединения **1** (фиолетовый) в комплексе с рибосомой, содержащей мутацию A2059G. *в* – Наложение структуры соединения **1** (фиолетовый) и **3** (голубой) в комплексе с рибосомой дикого типа. *г* – Наложение структуры соединения **1** (фиолетовый) и **3** (голубой) в комплексе с рибосомой, содержащей мутацию A2059G

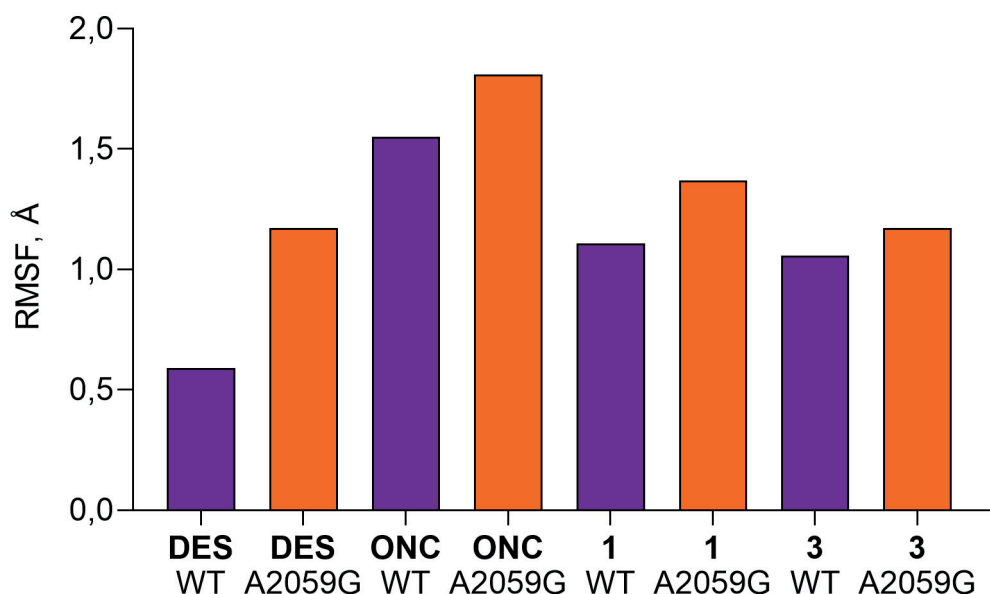


Рис. 6. Среднеквадратичные флуктуации атомов (RMSF) для структур конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми фрагментами онкоцина **1** и **3** в сравнении с DES и ONC в рибосоме *E. coli* дикого типа (WT, фиолетовый цвет) и *E. coli*, содержащей мутацию A2059G (оранжевый цвет) по данным молекулярной динамики

ся ацетильные группы (рис. 2), которые были введены по следующим соображениям. Ацетилирование антибиотиков обычно упоминается в литературе в контексте возникновения устойчивости у бактерий по отношению к ним [92, 93], однако в случае макролидов существуют природные антибиотики, ацетилированные или ацилированные по гидроксильным группам лактона и углеводных остатков (например, 14-членный макролид ланкамицин [94, 95], 16-членный макролид карбомицин А [28, 96] или триацетилолеандомицин [97, 98]). Введение ацильных и ацетильных заместителей в структуру макролидов улучшает фармакокинетические свойства антибиотиков [99, 100], а в некоторых случаях приводит к активным антибактериальным соединениям, действующим в отношении резистентных штаммов [27, 101, 102]. Кроме того, при конструировании конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина мы полагали, что введение ацетильных групп по 3, 2' и 4"-гидроксилам десмикозинового фрагмента должно ослабить взаимодействия макролидной части молекул с РТ вследствие нарушения водородных связей, образованных с участием этих гидроксильных групп [28, 98], и привести к большей подвижности десмикозинового фрагмента в комплексе конъюгата с рибосомой. Ослабление взаимодействий десмикозиновой части конъюгата с нуклеотидами РТ может способствовать тому, что влияние пептидных фрагментов онкоцина на связывание всей молекулы в целом проявится более отчетливо.

Сконструированные и синтезированные в данной работе конъюгаты **1–3** оказались

способными связываться с бактериальными рибосомами, однако степень их аффинности снижена по сравнению с исходным антибиотиком десмикозином и 3,2',4"-триацетилдесмикозином (рис. 3, а). Тем не менее все конъюгаты подавляют бактериальную трансляцию *in vitro* (рис. 3, б), причём конъюгат с тетрапептидным заместителем (**1**) по уровню ингибирования подобен DES. Эти результаты согласуются с данными тестирования в двойной репортёрной системе, где наибольшим ингибирующим действием среди полученных конъюгатов также обладает соединение **1** (рис. 4, а).

Конъюгаты **1** и **3** проявили активность в отношении устойчивых к макролидам штаммов (рис. 4), один из которых содержит ген метилазы ErmC, метилирующей A2058 [56], а два других содержат замены в 23S рРНК A2058G либо A2059G [103, 104]. Поскольку ацетилированное производное десмикозина (**6**) не проявляет значительной активности на резистентных штаммах (рис. 4 и табл. S1 в Приложении), по-видимому, такое действие конъюгатов **1** и **3** определяется наличием пептидных фрагментов в структуре этих соединений.

Для выяснения роли различных структурных элементов в молекулах конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми фрагментами онкоцина в их взаимодействии с бактериальными рибосомами были выполнены расчёты молекулярной динамики комплексов десмикозина, онкоцина и конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* дикого типа, а также с содержащей мутацию A2059G в 23S рРНК, приводящую к устойчивости соответствующего штамма к макролидам.

По-видимому, как и для других 16-членных макролидов, для взаимодействия с рибосомой конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (**1**, **3**) большое значение имеет возможность расположения тилонолида в комплексе с рибосомой оптимальным образом для образования ковалентной связи с н.о. A2062 23S рРНК. При взаимодействии конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* интенсивные взаимодействия онкоциновых фрагментов и наличие ацетильных группировок в десмикозиновой части соединений способствуют смещению тилонолида от оптимального расположения в MBS (рис. 5, *a*). Возможно также, что длина линкера на основе 4-аминобутановой кислоты, соединяющего макролидный и пептидные фрагменты конъюгатов, недостаточна, чтобы эти фрагменты могли в полной мере, синергически, взаимодействовать со своими участками РТ, не перетягивая друг друга. Вероятно, более длинный линкер, например, на основе δ -аминовалериановой или ϵ -аминокапроновой кислот, мог бы обеспечить синергическое действие онкоциновой и десмикозиновой частей конъюгата. Изменение расположения тилонолида в комплексах конъюгатов **1** и **3** с рибосомой подтверждается результатами расчёта среднеквадратичных флуктуаций атомов исследуемых соединений (RMSF), значения которых для соединений **1** и **3** выше, чем для исходного антибиотика DES (рис. 6). Этим может объясняться как уменьшение аффинности конъюгатов **1** и **3** к рибосоме, так и некоторое снижение их антибактериальной активности по сравнению с DES на рибосомах дикого типа (рис. 3, *a* и рис. 4).

В случае рибосомы *E. coli*, содержащей мутацию A2059G, происходит увеличение подвижности DES и соединений **1** и **3** в MBS по сравнению с рибосомой дикого типа (рис. 5 и 6), что свидетельствует о дестабилизации взаимодействий десмикозинового фрагмента с элементами РТ. Однако, если для DES такое изменение значительно и проявляется в снижении его антибактериальной активности по отношению к резистентному штамму, то флуктуация производных **1** и **3** увеличивается слабо, по-видимому, вследствие значительного вклада онкоцинового фрагмента во взаимодействие с рибосомой. Соединение **1** оказалось наиболее устойчивым к мутации в MBS: несмотря на ослабление взаимодействия десмикозиновой части конъюгата из-за влияния мутации, онкоциновый фрагмент «удерживает» десмикозиновую часть от покидания MBS. Это согласуется с тем, что данное производное

проявляет наибольшую активность в отношении резистентного штамма, содержащего мутацию A2059G в 23S РНК (рис. 4, *a*).

Таким образом, в настоящей работе показано, что модификация десмикозина фрагментами антимикробного пептида онкоцина приводит к соединениям, способным связываться с бактериальными рибосомами подобно десмикозину и онкоцину и подавлять трансляцию *in vitro*. Конъюгаты гекса- и тетрапептидных *N*-концевых фрагментов онкоцина с 3,2',4"-триацетилдесмикозином оказались активными в отношении штаммов, резистентных к макролидам. Методом молекулярной динамики найдены структурные особенности взаимодействий этих производных с бактериальными рибосомами, в том числе содержащими мутацию A2059G в 23S РНК, позволяющие объяснить полученные экспериментальные результаты.

Вклад авторов. З.З. Хайруллина – проведение экспериментов (синтез, связывание с рибосомами), обсуждение результатов исследования, написание текста, редактирование текста; Г.И. Макаров – моделирование молекулярной динамики, обсуждение результатов исследования, написание и редактирование текста; А.Г. Терещенков – проведение экспериментов (связывание с рибосомами), обсуждение результатов, написание и редактирование текста, оформление рисунков; В.С. Буев – проведение экспериментов (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность); Д.А. Лукьянов – проведение экспериментов (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность); В.И. Польшаков – проведение экспериментов (ЯМР), анализ данных; В.Н. Ташлицкий – проведение экспериментов (хроматография, масс-спектрометрия); И.А. Остерман – руководство работой, обсуждение результатов исследования; Н.В. Сумбатьян – концепция и руководство работой, обсуждение результатов, написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 20-04-00873-а (синтез аналогов, молекулярное моделирование, связывание с рибосомами), № 19-14-00115 (ЯМР исследования) и № 21-64-00006 (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность)).

Благодарности. Мы благодарим А.А. Богданова за инициирование и поддержку работ по изучению пептидных производных рибосомных антибиотиков. Авторы также благодарят

А.Л. Коневу за предоставленные для работы рибосомы; М.В. Серебрякову за масс-спектрометрические анализы; А.Л. Ксенофонтова за проведение аминокислотного анализа; О.Ю. Савельева за экспертную техническую помощь в измерениях ЯМР. Работа выполнена с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития Московского университета. Авторы выражают благодарность МГУ имени М.В. Ломоносова за возможность использовать установки ЯМР, а также Вычислительному центру МГУ имени

М.В. Ломоносова за предоставленную возможность вести расчёты молекулярной динамики на суперкомпьютере «Ломоносов-II».

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.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- König, G., Sokkar, P., Pryk, N., Heinrich, S., Möller, D., et al. (2021) Rational prioritization strategy allows the design of macrolide derivatives that overcome antibiotic resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2113632118, doi: 10.1073/pnas.2113632118.
- Llano-Sotelo, B., Dunkle, J., Klepacki, D., Zhang, W., Fernandes, P., et al. (2010) Binding and action of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic that inhibits protein synthesis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 4961-4970, doi: 10.1128/AAC.00860-10.
- Jelić, D., and Antolović, R. (2016) From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials, *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **5**, 29, doi: 10.3390/antibiotics5030029.
- Skripkin, E., McConnell, T. S., DeVito, J., Lawrence, L., Ippolito, J. A., et al. (2008) Rchi-01, a new family of oxazolidinones that overcome ribosome-based linezolid resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3550-3557, doi: 10.1128/AAC.01193-07.
- Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H., and Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021) Macrolides: from toxins to therapeutics, *Toxins*, **13**, 347, doi: 10.3390/toxins13050347.
- Fernandes, P., Martens, E., and Pereira, D. (2017) Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics, *J. Antibiot.*, **70**, 527-533, doi: 10.1038/ja.2016.137.
- Dinos, G. P. (2017) The macrolide antibiotic renaissance, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 2967-2983, doi: 10.1111/bph.13936.
- Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) How macrolide antibiotics work, *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 668-684, doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.011.
- Mankin, A. S. (2008) Macrolide myths, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 414-421, doi: 10.1016/j.mib.2008.08.003.
- Kannan, K., and Mankin, A. S. (2011) Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1241**, 33-47, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x.
- Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
- Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., and Korshunova, G. A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501-1516, doi: 10.1134/s0006297910130018.
- Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., et al. (2021) Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 412-420, doi: 10.1038/s41589-020-00715-0.
- Breiner-Goldstein, E., Eyal, Z., Matzov, D., Halfon, Y., Cimicita, G., et al. (2021) Ribosome-binding and anti-microbial studies of the mycinamicins, 16-membered macrolide antibiotics from *Micromonospora griseorubida*, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 9560-9573, doi: 10.1093/nar/gkab684.
- McGuire, J. M., Boniece, W. S., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., Stark, W. M., et al. (1961) Tylosin, a new antibiotic: I. Microbiological studies, *Antibiot. Chemother.*, **11**, 320-327.
- Baltz, R. H., Seno, E. T., Stonesifer, J., and Wild, G. M. (1983) Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. A preferred pathway from ty lactone to tylosin, *J. Antibiot.*, **36**, 131-141, doi: 10.7164/antibiotics.36.131.
- Hamill, R. L., Haney, M. E., and McGuire, J. M. (1965) Stamper MC: Antibiotics tylosin and desmicosin and derivatives thereof., Apr.13, U.S. Pat. № 3178341.
- Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., et al. (2018) 16-membered macrolide antibiotics: a review, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **51**, 283-298, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020.
- McColm, A. A., and McHardy, N. (1984) Evaluation of a range of antimicrobial agents against the parasitic protozoa, *Plasmodium falciparum*, *Babesia rodhaini* and *Theileria parva in vitro*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **78**, 345-354, doi: 10.1080/00034983.1984.11811831.
- Goodman, C. D., Useglio, M., Peirú, S., Labadie, G. R., McFadden, G. I., et al. (2013) Chemobiosynthesis of new antimalarial macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 907-913, doi: 10.1128/AAC.01825-12.
- Dahl, E. L., and Rosenthal, P. J. (2007) Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium*

- falciparum* apicoplast, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 3485-3490, doi: 10.1128/AAC.00527-07.
22. Von Geldern, T. W., Morton, H. E., Clark, R. F., Brown, B. S., Johnston, K. L., et al. (2019) Discovery of ABBV-4083, a novel analog of tylosin A that has potent anti-Wolbachia and anti-filarial activity, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13**, e0007159, doi: 10.1371/journal.pntd.0007159.
 23. Debono, M., Willard, K. E., Kirst, H. A., Wind, J. A., Crouse, G. D., et al. (1989) Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxy-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives, *J. Antibiot.*, **42**, 1253-1267, doi: 10.7164/antibiotics.42.1253.
 24. Miyake, T., Takita, M., Hamada, M., Takeuchi, T., and Umezawa, S. (2001) Macrolide antibiotics and treatment of pasteurellosis, Patent WO2001016148A1.
 25. Kleefeld, G., Froyman, R., Ludwig, C., Omura, S., Sunazuka, T., Tomoyasu, H., Akihiro, S., Kazuro, S. (2014) WO2014/187957 Tylosin derivatives and method for preparation thereof.
 26. Phan, L. T., Jian, T., Chen, Z., Qiu, Y. L., Wang, Z., et al. (2004) Synthesis and antibacterial activity of a novel class of 4'-substituted 16-membered ring macrolides derived from tylosin, *J. Med. Chem.*, **47**, 2965-2968, doi: 10.1021/jm034233n.
 27. Kiyoshima, K., Sakamoto, M., Nomura, H., Yoshioka, T., Okamoto, R., et al. (1989) Structure-activity relationship studies on 4"-O-acyltylosin derivatives: significance of their 23-O-mycinosyl and 4"-O-acyl moieties in antimicrobial activity against macrolide-resistant microbes, *J. Antibiot.*, **42**, 1661-1672, doi: 10.7164/antibiotics.42.1661.
 28. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., et al. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117-128, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00570-1.
 29. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905-920, doi: 10.1126/science.289.5481.905.
 30. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, **289**, 920-930, doi: 10.1126/science.289.5481.920.
 31. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., et al. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a *Mesophilic Eubacterium*, *Cell*, **107**, 679-688, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00546-3.
 32. Pavlova, A., Parks, J. M., Oyeler, A. K., and Gumbart, J. C. (2017) Toward the rational design of macrolide antibiotics to combat resistance, *Chem. Biol. Drug Des.*, **90**, 641-652, doi: 10.1111/cbdd.13004.
 33. Sugawara, A., Maruyama, H., Shibusawa, S., Matsui, H., Hirose, T., et al. (2017) 5-O-Mycaminosyltylonolide antibacterial derivatives: design, synthesis and bioactivity, *J. Antibiot.*, **70**, 878-887, doi: 10.1038/ja.2017.61.
 34. Fu, H., Marquez, S., Gu, X., Katz, L., and Myles, D. C. (2006) Synthesis and *in vitro* antibiotic activity of 16-membered 9-O-arylalkyloxime macrolides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1259-1266, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.061.
 35. Karahalios, P., Kalpaxis, D. L., Fu, H., Katz, L., Wilson, D. N., et al. (2006) On the mechanism of action of 9-O-arylalkyloxime derivatives of 6-O-mycaminosyltylonolide, a new class of 16-membered macrolide antibiotics, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1271-1280, doi: 10.1124/mol.106.026567.
 36. Sumbatyan, N. V., Korshunova, G. A., and Bogdanov, A. A. (2003) Peptide derivatives of antibiotics tylosin and desmycosin, protein synthesis inhibitors, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 1156-1158, doi: 10.1023/a:1026318914546.
 37. Starosta, A. L., Karpenko, V. V., Shishkina, A. V., Mikolajka, A., Sumbatyan, N. V., et al. (2010) Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition, *Chem. Biol.*, **17**, 504-514, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.008.
 38. Shishkina, A., Makarov, G., Tereshchenkov, A., Korshunova, G., Sumbatyan, N., et al. (2013) Conjugates of amino acids and peptides with 5-O-mycaminosyltylonolide and their interaction with the ribosomal exit tunnel, *Bioconjugate Chem.*, **24**, 1861-1869, doi: 10.1021/bc400236n.
 39. Schneider, M., and Dorn, A. (2001) Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera), *J. Invertebr. Pathol.*, **78**, 135-140, doi: 10.1006/jipa.2001.5054.
 40. Knappe, D., Piantavigna, S., Hansen, A., Mechler, A., Binas, A., et al. (2010) Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRRRIYNR-NH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens, *J. Med. Chem.*, **53**, 5240-5247, doi: 10.1021/jm100378b.
 41. Seefeldt, A. C., Nguyen, F., Antunes, S., Pérébasquine, N., Graf, M., et al. (2015) The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 470-475, doi:10.1038/nsmb.3034.
 42. Polikanov, Y. S., Aleksashin, N. A., Beckert, B., and Wilson, D. N. (2018) The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics, *Front. Mol. Biosci.*, **5**, 48, doi: 10.3389/fmolb.2018.00048.
 43. Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., and Steitz, T. A. (2015) The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 466-469, doi: 10.1038/nsmb.3031.
 44. Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., et al. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
 45. Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., et al. (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of BODIPY®-erythromycin probes for bacterial ribosomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 794-797, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.028.

46. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., et al. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR*, **6**, 277-293, doi: 10.1007/BF00197809.
47. Lee, W., Tonelli, M., and Markley, J. L. (2015) NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy, *Bioinformatics*, **31**, 1325-1327, doi: 10.1093/bioinformatics/btu830.
48. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., et al. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics*, **4**, 17, doi: 10.1186/1758-2946-4-17.
49. Yan, K., Hunt, E., Berge, J., May, E., Copeland, R. A., et al. (2005) Fluorescence polarization method to characterize macrolide-ribosome interactions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3367-3372, doi: 10.1128/AAC.49.8.3367-3372.2005.
50. Tereshchenkov, A. G., Dobosz-Bartoszek, M., Osterman, I. A., Marks, J., Sergeeva, V. A., et al. (2018) Binding and action of amino acid analogs of chloramphenicol upon the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **430**, 842-852, doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.016.
51. Wang, Z. X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Lett.*, **360**, 111-114, doi: 10.1016/0014-5793(95)00062-e.
52. Polikanov, Y. S., Osterman, I. A., Szal, T., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., et al. (2014) Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome, *Mol. Cell*, **56**, 531-540, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.020.
53. Svetlov, M. S., Kommer, A., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2006) Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family, *Protein Sci.*, **15**, 242-247, doi: 10.1110/ps.051752506.
54. Osterman, I. A., Komarova, E. S., Shiryayev, D. I., Korniltsev, I. A., Khven, I. M., et al. (2016) Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 7481-7489, doi: 10.1128/AAC.02117-16.
55. Zakalyukina, Y. V., Birykov, M. V., Lukianov, D. A., Shiriaev, D. I., Komarova, E. S., et al. (2019) Nybomycin-producing *Streptomyces* isolated from carpenter ant *Camponotus vagus*, *Biochimie*, **160**, 93-99, doi: 10.1016/j.biochi.2019.02.010.
56. Hardy, K., and Haefeli, C. (1982) Expression in *Escherichia coli* of a staphylococcal gene for resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics, *J. Bacteriol. Res.*, **152**, 524-526, doi: 10.1128/jb.152.1.524-526.1982.
57. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., et al. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, doi: 10.1038/s41467-020-16694-8.
58. Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., and Cate, J. H. (2010) Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17152-17157, doi: 10.1073/pnas.1007988107.
59. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., et al. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinform.*, **3**, 2, doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
60. Byrd, R., Lu, P., and Nocedal, J. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization, *SIAM J. Scientific. Comput.*, **16**, 1190-1208, doi: 10.1137/0916069.
61. Petrone, P. M., Snow, C. D., Lucent, D., and Pande, V. S. (2008) Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16549-16554, doi: 10.1073/pnas.0801795105.
62. Lucent, D., Snow, C. D., Aitken, C. E., and Pande, V. S. (2010) Non-bulk-like solvent behavior in the ribosome exit tunnel, *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000963, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000963.
63. Ruiz-Carmona, S., Alvarez-Garcia, D., Foloppe, N., Garmendia-Doval, A. B., Juhos, S., et al. (2014) rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003571, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003571.
64. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, free, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1701-1718, doi: 10.1002/jcc.20291.
65. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
66. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., et al. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
67. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157-1174, doi: 10.1002/jcc.20035.
68. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10269-10280, doi: 10.1021/j100142a004.
69. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.*, **18**, 1463-1472, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
70. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101, doi: 10.1063/1.2408420.
71. Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A., and Haak, J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690, doi: 10.1063/1.448118.

72. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an N²-log(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089-10092, doi: 10.1063/1.464397.
73. Horn, H. W., Swope, W. C., Pitner, J. W., Madura, J. D., Dick, T. J., et al. (2004) Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: TIP4P-Ew, *J. Chem. Phys.*, **120**, 9665-9678, doi: 10.1063/1.1683075.
74. Joung, I. S., and Cheatham, T. E., 3rd (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 9020-9041, doi: 10.1021/jp8001614.
75. Athavale, S. S., Petrov, A. S., Hsiao, C., Watkins, D., Prickett, C. D., et al. (2012) RNA folding and catalysis mediated by iron (II), *PLoS One*, **7**, e38024, doi: 10.1371/journal.pone.0038024.
76. Barducci, A., Bussi, G., and Parrinello, M. (2008) Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 020603, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.020603.
77. Domene, C., Barbini, P., and Furini, S. (2015) Bias-exchange metadynamics simulations: an efficient strategy for the analysis of conduction and selectivity in ion channels, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 1896-1906, doi: 10.1021/ct501053x.
78. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new features for an old bird, *Comput. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
79. Makarov, G. I., Sumbatyan, N. V., and Bogdanov, A. A. (2017) Structural insight into interaction between C20 phenylalanyl derivative of tylosin and ribosomal tunnel, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 925-932, doi: 10.1134/S0006297917080077.
80. Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W. F., et al. (1999) Peptide folding: when simulation meets experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 236-240, doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M.
81. Ludwig, T., Krizsan, A., Mohammed, G. K., and Hoffmann, R. (2022) Antimicrobial activity and 70S ribosome binding of apidaecin-derived Api805 with increased bacterial uptake rate, *Antibiotics*, **11**, 430, doi: 10.3390/antibiotics11040430.
82. Kolano, L., Knappe, D., Volke, D., Sträter, N., and Hoffmann, R. (2020) Ribosomal target-binding sites of antimicrobial peptides Api137 and Onc112 are conserved among pathogens indicating new lead structures to develop novel broad-spectrum antibiotics, *Chembiochem.*, **21**, 2628-2634, doi: 10.1002/cbic.202000109.
83. Krizsan, A., Volke, D., Weinert, S., Sträter, N., Knappe, D., et al. (2014) Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 12236-12239, doi: 10.1002/anie.201407145.
84. Holfeld, L., Hoffmann, R., and Knappe, D. (2017) Correlating uptake and activity of proline-rich antimicrobial peptides in *Escherichia coli*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 5581-5592, doi: 10.1007/s00216-017-0496-2.
85. Tereshchenkov, A. G., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., Chertkov, V. A., Konevega, A. L., et al. (2016) New fluorescent macrolide derivatives for studying interactions of antibiotics and their analogs with the ribosomal exit tunnel, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1163-1172, doi: 10.1134/S0006297916100138.
86. Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2012) Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel, *Cell*, **151**, 508-520, doi: 10.1016/j.cell.2012.09.018.
87. Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) Context-specific action of ribosomal antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.*, **72**, 185-207, doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062329.
88. Beckert, B., Leroy, E. C., Sothselvam, S., Bock, L. V., Svetlov, M. S., et al. (2021) Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics, *Nat. Commun.*, **12**, 4466, doi: 10.1038/s41467-021-24674-9.
89. Dzyubak, E., and Yap, M. N. (2016) The expression of antibiotic resistance methyltransferase correlates with mRNA stability independently of ribosome stalling, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 7178-7188, doi: 10.1128/AAC.01806-16.
90. Vester, B., and Douthwaite, S. (2001) Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1-12, doi: 10.1128/AAC.45.1.1-12.2001.
91. Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2005) Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance, *Cell*, **121**, 257-270, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.005.
92. Jeong, C. S., Hwang, J., Do, H., Cha, S. S., Oh, T. J., et al. (2020) Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*, *Sci. Rep.*, **10**, 21503, doi: 10.1038/s41598-020-78699-z.
93. Shaw, W. V. (1984) Bacterial resistance to chloramphenicol, *Br. Med. Bull.*, **40**, 36-41, doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071945.
94. Gäumann, E., Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Neipp, L., Prelog, V., et al. (1960) Lankamycin und lankacidin, *Helv. Chim. Acta*, **80**, 601-606, doi: 10.1002/hlca.19600430221.
95. Belousoff, M. J., Shapira, T., Bashan, A., Zimmerman, E., Rozenberg, H., et al. (2011) Crystal structure of the synergistic antibiotic pair, lankamycin and lankacidin, in complex with the large ribosomal subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2717-2722, doi: 10.1073/pnas.1019406108.
96. Wagner, R. L., Hochstein, F. A., Murai, K., Messina, N., and Regna, P. P. (1953) Magnamycin. A new antibiotic, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4684-4687, doi: 10.1021/ja01115a019.
97. Ross, S. (1968) Erythromycin, oleandomycin and triacetyloleandomycin, *Pediatr. Clin. N. Am.*, **15**, 119-129, doi: 10.1016/s0031-3955(16)32093-4.
98. Gürel, G., Blaha, G., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2009) Structures of triacetyloleandomycin and

- mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 5010-5014, doi: 10.1128/AAC.00817-09.
99. Sano, M., Sunazuka, T., Tanaka, H., Yamashita, K., Okachi, R., et al. (1985) Chemical modification of spiramycins. VI. Synthesis and antibacterial activities of 3,3"-di-O-acyl-4"-O-sulfonyl and 3,3"-di-O-acyl-4"-O-alkyl derivatives of spiramycin I, *J. Antibiot.*, **38**, 1350-1358, doi: 10.7164/antibiotics.38.1350.
100. Omura, S., Katagiri, M., Umezawa, I., Komiyama, K., and Maekawa, T. (1968) Structure-biological activities relationships among the leucomycins and their derivatives, *J. Antibiot.*, **21**, 532-538, doi: 10.7164/antibiotics.21.532.
101. Okamoto, R., Fukumoto, T., Nomura, H., Kiyoshima, K., Nakamura, K., et al. (1980) Physico-chemical properties of new acyl derivatives of tylosin produced by microbial transformation, *J. Antibiot.*, **33**, 1300-1308, doi: 10.7164/antibiotics.33.1300.
102. Huang, G., Okabe, M., Kahar, P., Tsunekawa, H., and Park, Y. (2001) Optimization of tylosin feeding rate profile in production of acetyl-isovaleryl tylosin (AIV) from tylosin by *Streptomyces thermotolerans* YN554, *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 504-508, doi: 10.1263/jbb.91.504.
103. Ettayebi, M., Prasad, S. M., and Morgan, E. A. (1985) Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **162**, 551-557, doi: 10.1128/jb.162.2.551-557.1985.
104. Sander, P., Prammananan, T., Meier, A., Frischkorn, K., and Böttger, E. C. (1997) The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance, *Mol. Microbiol.*, **26**, 469-480, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5811946.x.

CONJUGATES OF DESMYCOSIN WITH FRAGMENTS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ONCOCIN: SYNTHESIS, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, INTERACTION WITH RIBOSOME

Z. Z. Khairullina¹, G. I. Makarov², A. G. Tereshchenkov³, V. S. Buev⁴, D. A. Lukianov^{1,5}, V. I. Polshakov⁶, V. N. Tashlitsky¹, I. A. Osterman^{1,5}, and N. V. Sumbatyan^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: sumbtyan@belozersky.msu.ru

² South Ural State University, 454080 Chelyabinsk, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁵ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143025 Skolkovo, Russia

⁶ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Design and synthesis of conjugates consisting of the macrolide antibiotic desmycosin and fragments of the antibacterial peptide oncocin were performed to develop approaches to the creation of new antimicrobial compounds. New compounds were shown to bind to the *E. coli* 70S ribosomes, to inhibit bacterial protein synthesis *in vitro* as well as to suppress bacterial growth. The conjugates of *N*-terminus hexa- and tripeptide fragments of oncocin and 3,2',4"-triacetyldesmycosin were found to be active against some strains of macrolide-resistant bacteria. By simulating the dynamics of the complexes of these compounds with wild-type bacterial ribosomes and with ribosomes, containing A2059G 23S RNA mutation, the specific structural features of their interactions, were revealed.

Keywords: macrolides, peptide derivatives, antimicrobial peptides, ribosome, molecular dynamics simulations, nascent peptide exit tunnel

УДК 57.088

РАСТИТЕЛЬНО-ПОЛИСАХАРИДНЫЙ ЭРРЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2022 А.В. Никифорова^{1*}, В.В. Головченко², П.В. Микшина³, О.А. Патова²,
Т.А. Горшкова³, Н.В. Бовин¹, Н.В. Шилова¹

¹ ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: nikiforovaalica@gmail.com

² ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
167982 Сыктывкар, Россия

³ ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казанский институт биохимии и биофизики,
420111 Казань, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2022

После доработки 20.06.2022

Принята к публикации 20.06.2022

Специфичность большинства углеводов-связывающих белков растений либо не изучалась, либо охарактеризована ограниченно, о многих из них известно лишь благодаря биоинформатическому анализу геномов. Задачу расшифровки углеводной специфичности белков позволяют решать гликоэреи – систематические наборы большого количества гликанов, как правило, иммобилизованных на подложке (подложку с гликоэрреем называют гликочипом). Растительные углеводы являются наиболее естественными лигандами для изучения растительных белков. В представленной работе показано, что растительные полисахариды без дополнительной модификации иммобилизуются на поверхности, несущей активированные N-гидроксисукцинимидом карбоксильные группы. С использованием этого подхода был сконструирован эррей, состоящий из 113 хорошо охарактеризованных растительных полисахаридов, выделенных из клеточных стенок различных растений, 23 олиго-моносахарида, являющихся компонентами некоторых растительных полисахаридов и гликозилированных белков, а также ряда лигандов широко известных растительных лектинов. При химической иммобилизации полисахаридов их функциональная активность сохранялась, что следует из результатов взаимодействия с моноклональными и поликлональными антителами и растительным лектином – рицином. С помощью гликоэррея была найдена ранее неизвестная способность рицина связывать полисахариды клеточных стенок, что значительно расширяет представление о его специфичности. Также в периферической крови человека обнаружено наличие множества антител к пектинам и гемицеллюлозам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: углевод-связывающие белки, растительные лектины, растительные полисахариды, пектины, полисахаридный гликоэррей, гликочип, INRA-RU2, антигликановые антитела человека.

DOI: 10.31857/S0320972522070077, EDN: AVWMQS

ВВЕДЕНИЕ

Углевод-связывающие белки (УСБ) и, в частности, лектины, широко представлены в растениях. Эти белки вовлечены во множество процессов, включая иммунные и другие защитные реакции, а также играют ключевые роли в развитии растений [1, 2]. Однако оста-

ётся слабо изученной реальная специфичность растительных УСБ, что связано в первую очередь с отсутствием подходящих методов её определения.

Гликоэррей (printed glycan array) является одним из эффективных инструментов, используемых для характеристики специфичности УСБ [3–6]. Известные гликоэрреи

Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ТФУ – трифторуксусная кислота; УСБ – углевод-связывающие белки; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; АГА – апиогалактуронан; НГ – гомогалактуронан; М_w и М_n – средневесовая и среднечисловая относительные молекулярные массы соответственно; NHS – N-гидроксисукцинимид; RG-I – рамногалактуронан I-го типа; RG-II – рамногалактуронан II-го типа; XGA – ксилогалактуронан.

* Адресат для корреспонденции.

составлены из олигосахаридов разной природы и размеров — как синтетических, так и выделенных из природных источников, а также полисахаридов, в том числе и растительных [5, 7–9]. Олигосахариды обычно иммобилизуют на активированную (как правило N-гидроксисукцинимидом (NHS)) поверхность, для чего их необходимо предварительно функционализировать аминогруппой [5] либо превратить в неогликоконъюгаты, например, с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [10]; подложку с нанесённым на неё гликоэрреем называют гликочипом. Несмотря на то что олигосахариды — фрагменты полисахаридов — не сохраняют конформацию последних, олигосахаридный эррей оказался весьма полезным для картирования эпитопов моноклональных антител к полисахаридам [7].

Растительные полисахариды можно иммобилизовать без функционализации, для чего используют слайды, покрытые нитроцеллюлозой [11]. Это позволяет избежать изменений в структуре, связанных с модификациями (порой критическими), с одной стороны, а с другой — делает невозможным детектировать слабые сигналы из-за высокого фона автофлуоресценции нитроцеллюлозы. Тем не менее такие эрреи стали основой для изучения полисахаридов методом детального профилирования полимеров на микрочипах (CoMPP, comprehensive microarray polymer profiling). Данная технология заключается в том, что полисахариды клеточной стенки растений в варьруемых условиях экстрагируют, затем иммобилизуют на подложке и исследуют их структурные особенности с помощью набора моноклональных антител [12]. Технология CoMPP позволяет изучать биологические процессы, происходящие в клеточной стенке, в частности на стадии роста клетки, а также при воздействии патогена [12–14]. По этой технологии структурная характеристика проводится лишь для некоторых фракций, выбранных благодаря данным гликоэррея [12, 15]. В литературе описан комбинированный вариант гликоэррея с одновременным присутствием различных олигосахаридов млекопитающих и *бактериальных* полисахаридов [16–18], однако аналога с *растительными* олиго- и полисахаридами в литературе нами не было найдено.

Целью данной работы было исследование потенциала использования гликочипа — активированного слайда с напечатанными на нём предварительно охарактеризованными растительными полисахаридами и олиго-моносахаридами — в определении профиля специфичности некоторых гликан-связывающих

белков, а именно: рицина — лектина, специфичность которого считается известной; пула антител периферической крови человека, гликан-связывающий потенциал которого также известен [19, 20], а также моноклонального антитела INRA-RU2, узнающего остов рамногалактуронана I (RG-I) [21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание библиотеки полисахаридов. Подготовка полисахаридов из коммерческих источников. Образцы полисахаридов (пектины картофеля, люпина, цитрусовых, яблока, сахарной свёклы, арабиногалактаны лиственницы и акации, гемицеллюлозы ячменя, пшеницы, тамаринда и кэроба, «Megazyme», Ирландия) растворяли, согласно предоставляемым фирмой протоколам (основной растворитель — деионизованная вода). При очистке и анализе полисахаридов использовали 2 протокола. По первому протоколу определяли молекулярно-массовое распределение, степень полидисперсности и чистоты, затем образцы обессоливали, используя сефадекс G-25 и лиофильно высушивали. По второму протоколу образцы изначально трижды обессоливали на колонке с сефадексом G-25, затем характеризовали по аналогичным первому протоколу параметрам и также лиофильно высушивали. Кроме того, в работе использованы образцы коммерческих низко- и высокометилэтерифицированных яблочных и цитрусовых пектинов («Herbstreith & Fox KG», Германия), для которых предварительное обессоливание не проводилось.

Растительные полисахариды из природных источников. Фракции пектиновых полисахаридов получены последовательной экстракцией водой (при pH 5,6; 4,0 и 2,0), 0,7%-ным водным раствором оксалата аммония из листьев чемерицы Лобеля *Veratrum lobelianum* Bernh., бада-на толстолистного *Bergenia crassifolia* L., берёзы пушистой *Betula alba* L., берёзы повислой *Betula pendula* Roth., капусты огородной *Brassica oleracea* spp., борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi* L., сабельника болотного *Comarum palustre* L., солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L., ревеня волнистого *Rheum rhabarbarum* L., луковиц лука репчатого *Allium cepa* L., наземной части хвоща лесного *Equisetum sylvaticum* L., смолёвки обыкновенной *Oberna behen* L., стеблей и листьев рдеста плавающего *Potamogeton natans* L., побегов и листьев взморника морского *Zostera marina* L., целого растения ряски малой *Lemna minor* L., древесной зелени сосны сибирской кедровой (кедр сибирский)

Pinus sibirica DuRoi., лиственницы европейской *Larix decidua* Mill., пихты сибирской *Abies sibirica* Ldb., соцветий пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., плодов винограда культурного *Vitis vinifera* L., баобаба *Adansonia digitata* L., корнеплодов моркови посевной *Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Schübl. & Martens, каллусной культуры пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., смолёвки обыкновенной *Oberna behen* L., смолёвки татарской *Silene tatarica* (L.) Pers. и ряски малой *Lemna minor* L. Для получения гомогенных образцов пектиновых полисахаридов выделенные фракции разделяли последовательной ультрафильтрацией на мембранах с различным размером пор (300, 100, 50 ($\times 10^3$) г/моль), на ДЭАЭ-целлюлозе (ОН⁻) и на сефарозе CL-4В. Рамно-галактуронаны I (RG-I), несущие галактановые боковые цепи различной длины, а также арабиногалактан были выделены из волокон льна *Linum usitatissimum* L. на разных стадиях развития растений. Первый вариант RG-I и арабиногалактан были получены из волокон на стадии быстрого роста растений путём экстракции 10 мМ NaOAc-буфером, содержащим 0,02% NaN₃ (pH 5,0–5,2), и последующего разделения полимеров с помощью гель-фильтрации на сефарозе CL-4В. Второй вариант RG-I получен из зрелых волокон после растворения целлюлозы в обезвоженном N,N-диметилацетамиде, содержащем 8% LiCl, последующего её гидролиза целлюлазой «Cellusoft-L» («Novo Nordisk Bioindustri S.A.», Франция) и очистки высвобождаемой фракции полимеров с помощью диализа (MWCO 12 000) и гель-фильтрации на сефадексе G-25 и сефарозе CL-4В. Гетероксиланы из семян ржи *Secale cereale* L. (мука грубого помола) получали после обработки экстрагируемых водой и предварительно осаждённых 96%-ным спиртом полимеров лихеназой («Megazyme») и последующего разделения фрагментов на сефадексе G-25.

Конечная библиотека лигандов содержала 113 полисахаридов (см. таблицу в Приложении).

Характеристика состава и свойств образцов полисахаридов. Общее содержание углеводов в образцах определяли фенол-сернокислотным методом [22]. Содержание уроновых кислот в образцах полисахаридов определяли спектрофотометрическим методом с использованием гидроксифенила (калибровочный стандарт – галактуроновая кислота, фотоколориметрирование – при 400 и 450 нм) [23]. Содержание белка в образцах полисахаридов определяли по методу Лоури (калибровочный стандарт – БСА, фотоколориметрирование – при 750 нм) [24]; содержание метоксильных

групп определяли по реакции с пентан-2,4-дионом (калибровочный стандарт – метанол, фотоколориметрирование – при 412 нм) [25]. Стабильность полисахаридов в условиях печати эррея оценивали следующим образом: образцы растворяли в 300 мМ Na₂HPO₄ (pH 8,5) и выдерживали в течение 1–3 суток при комнатной температуре либо при –20 °С. Появление продуктов β-элиминирования, поглощающих при 235 нм, оценивали каждые 12 ч.

Измерение поглощения растворов проводили на спектрофотометре Ultrospec 3000 («Pharmacia Biotech», Великобритания) либо на ПЭ-5300ВИ («Экротхим», Россия).

Моносахаридный состав полисахаридов определяли методами газожидкостной и ионообменной хроматографии. В первом случае 2,5 мг образца полисахарида растворяли в 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ), содержащей в качестве внутреннего стандарта миоинозит (0,5 мг/мл). Смесь термостатировали в запаянной ампуле (5 ч, 100 °С) и далее обрабатывали, как описано ранее [26]. Полученные ацетаты полиолов соответствующих моносахаридов анализировали на капиллярной колонке VF-5ms размером 0,25 мм Ø × 30 м («Varian», США), используя пламенно-ионизационный детектор («Varian»), газ-носитель – гелий. Во втором случае 20–50 мкг полисахарида гидролизовали в 400 мкл 2 М ТФУ (1 ч, 120 °С), избыток ТФУ удаляли упариванием, смесь полученных моносахаридов растворяли в деионизированной воде. Разделение моносахаридов проводили на колонке CarboPac PA-1 размером 4 × 250 мм («Thermo Fisher Scientific», США), используя импульсный амперометрический детектор PAD («Thermo Fisher Scientific»). Скорость элюирования – 1 мл/мин. Температура колонки 30 °С. Элюенты: А – 100 мМ NaOH в 1 М NaOAc, В – 15 мМ NaOH; элюирование по схеме: В – 100% (0–20 мин); В – 90%, А – 10% (20–21 мин); В – 50%, А – 50% (22–41 мин); А – 100% (42–55 мин); В – 100% (56–85 мин). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения PeakNet версия 4.1 («Dionex», США).

Средневесовую (Mw), среднечисловую (Mn) относительные молекулярные массы образцов полисахаридов определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии либо на колонке Shodex OHpak SB-806M HQ размером 8 × 300 мм («Showa Denko», США), температура колонки – 50 °С, скорость потока – 0,3 мл/мин, элюент – деионизованная вода (термостатирование), либо на колонке PSS SUPREMA 3000 Å размером 8 × 300 мм («PSS», Германия), температура ко-

лонки – 40 °С, скорость потока – 0,4 мл/мин, элюент – 0,15 М NaCl, используя рефрактометрический детектор («Agilent», США или «Shimadzu», Япония соответственно). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Agilent GPC/SEC или LCsolution версия 1.24 SP1.

Растворы полисахаридов концентрировали на роторном испарителе Laborota 4002-control («Heidolph», Германия) при 40 °С, лиофилизировали на приборе Freezemobile 3SL («VirTis», США). pH растворов определяли на pH-метре MP 225 («Mettler Toledo», Швейцария).

Печать растительного полисахаридного чипа. Растительные полисахариды (полученные как описано выше) и олиго-моносахариды в аминокислотной форме («Синтавр», Россия) растворяли в буфере для печати (300 мМ Na₂HPO₄), отфильтрованном через 0,2 мкм-фильтр и содержащем 0,001% (v/v) Tween 20 или 0,005% CHAPS (pH 8,5), и переносили в лунки 384-луночного планшета для ПЦР («BIOPlastics», Нидерланды). С помощью робота SciFlexArrayer S5 («Sciencion», Германия) производили печать лигандов бесконтактным способом при относительной влажности 50%, объём капель – ~0,9 пл. Использовали два типа подложек – эпоксид-активированные («Семиотик», Россия) и NHS-активированные слайды Н («Schott Nexterion», Германия). Концентрация олигосахаридов в наносимых на подложку растворах составляла 20 мкМ, полисахариды наносили в концентрации 100 мкг/мл. Каждый лиганд печатали в девяти повторах. После печати гликочипы инкубировали 1–3 ч при относительной влажности 75% и упаковывали под вакуумом.

Изучение взаимодействия УСБ с лигандами полисахаридного эррея. Гликочипы выдерживали в буфере для блокировки (25 мМ этаноламина («Sigma-Aldrich», США), 100 мМ борной кислоты («Люми», Россия), 0,2% (v/v) Tween 20 («Sigma-Aldrich»), pH 8,5) в течение 90 мин при постоянном помешивании при комнатной температуре, после чего 2 раза промывали фосфатно-солевым буфером («Эко-Сервис», Россия), содержащим 0,05% (v/v) Tween 20 (ФСБ-0,05%). Далее исследуемые образцы наносили на чип, как описано ниже.

1. 1 мл раствора моноклонального антитела INRA-RU2 (любезно предоставленного Мари-Кристин Рале и Фабьен Гийон (Французский национальный институт сельскохозяйственных исследований, Нант, Франция)) в разведении 1 : 10 в ФСБ, содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 и 1% БСА (ФСБ-0,1%; «Sigma», США), инкубировали 1 ч при 37 °С

и повышенной влажности, после этого 2 раза промывали в ФСБ-0,05%. Затем наносили на гликочип 1 мл раствора биотинилированных антител козы, узнающих иммуноглобулины мыши («Thermo Scientific», США), разведённых 1 : 200 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее 2 раза промывали в ФСБ-0,05%. Затем наносили на чипы по 1 мл раствора стрептавидина, меченного флуоресцентной меткой Alexa 555 («Invitrogen», США), разведённого 1 : 1000 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

2. 1 мл раствора стандартной плазмы крови («Sigma», США) в разведении 1 : 15 в ФСБ-0,1% инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее промывали гликочип, как описано выше. Затем наносили раствор вторичных антител козы, узнающих человеческие IgG и IgM, меченные Alexa 555 и Alexa 647 соответственно («Invitrogen»), разведённых 1 : 250 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

3. 1 мл раствора биотинилированного рибцина RCA120 («Vector Laboratories», США) с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ-0,1% инкубировали 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее промывали, как описано выше. Затем наносили раствор стрептавидина, меченного флуоресцентной меткой Alexa 555 («Invitrogen»), в разведении 1 : 1000 в ФСБ-0,1% и инкубировали 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

Подготовленные гликочипы промывали 2 раза ФСБ-0,05% и на конечном этапе – в бидистиллированной воде, а затем высушивали чипы центрифугированием и сканировали (разрешение – 10 мкм) с помощью флуоресцентного ридера InnoScan 1100 AL («Innopsys», Франция). Полученные изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ридера ScanArray Express 4.0 с использованием метода подстраивающихся колец («PerkinElmer», США) и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы относительных единиц флуоресценции (RFU), отражающей аффинность и количество УСБ. Сигналы, величины которых были ниже 5% от максимального значения RFU, считали незначимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание библиотеки олиго- и полисахаридов. Полисахариды выделяли из клеточных стенок растений и каллусных культур, а также использовали коммерчески доступные полиса-

хариды («Megazyme» и «Herbstreith & Fox KG»), дополнительно очищенные от низкомолекулярных примесей и фракционированные с помощью ультрафильтрации, ионообменной и гель-проникающей хроматографий. Для полученных образцов полисахаридов определяли моносакхаридный состав, степень этерификации (СМ), средневесовую (Mw) и среднечисловую (Mn) относительные молекулярные массы, индекс полидисперсности (Mw/Mn) и содержание в них белковых примесей. Полная характеристика выделенных полисахаридов представлена в таблице в Приложении; большая часть из них относится к пектинам, ряд образцов был представлен гемицеллюлозами (рис. 1).

В пектинах выделяют следующие структурные домены: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан I-го типа (RG-I), замещённые галактуронаны, к которым относятся ксилогалактуронан (XGA), апиогалактуронан (AGA) и рамногалактуронан II-го типа (RG-II) [27, 28]. Для каждого из них характерно своё, специфическое соотношение моносакхаридных остатков.

Все использованные пектины были охарактеризованы по содержанию HG и RG-I. В соответствии с классическими представлениями остов RG-I сформирован повторяющимися дисахаридными звеньями $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-(1}\rightarrow]$ и содержит эквивалентное количество Rha и GalA; цепи HG построены из остатков GalA, связанных между собой 1,4-связями [25]. Исходя из этого, содержание HG в пектинах мы оценивали по доле остатков GalA от суммы всех моносакхаридов с учётом вычета остатков GalA, входящих в состав RG-I (определяли как разность $(\text{GalA} - \text{Rha})$). Для характеристики пектинов по содержанию RG-I оценивали суммарную долю остатков Rha и GalA $(\text{Rha} \times 2)$ от суммы всех моносакхаридов.

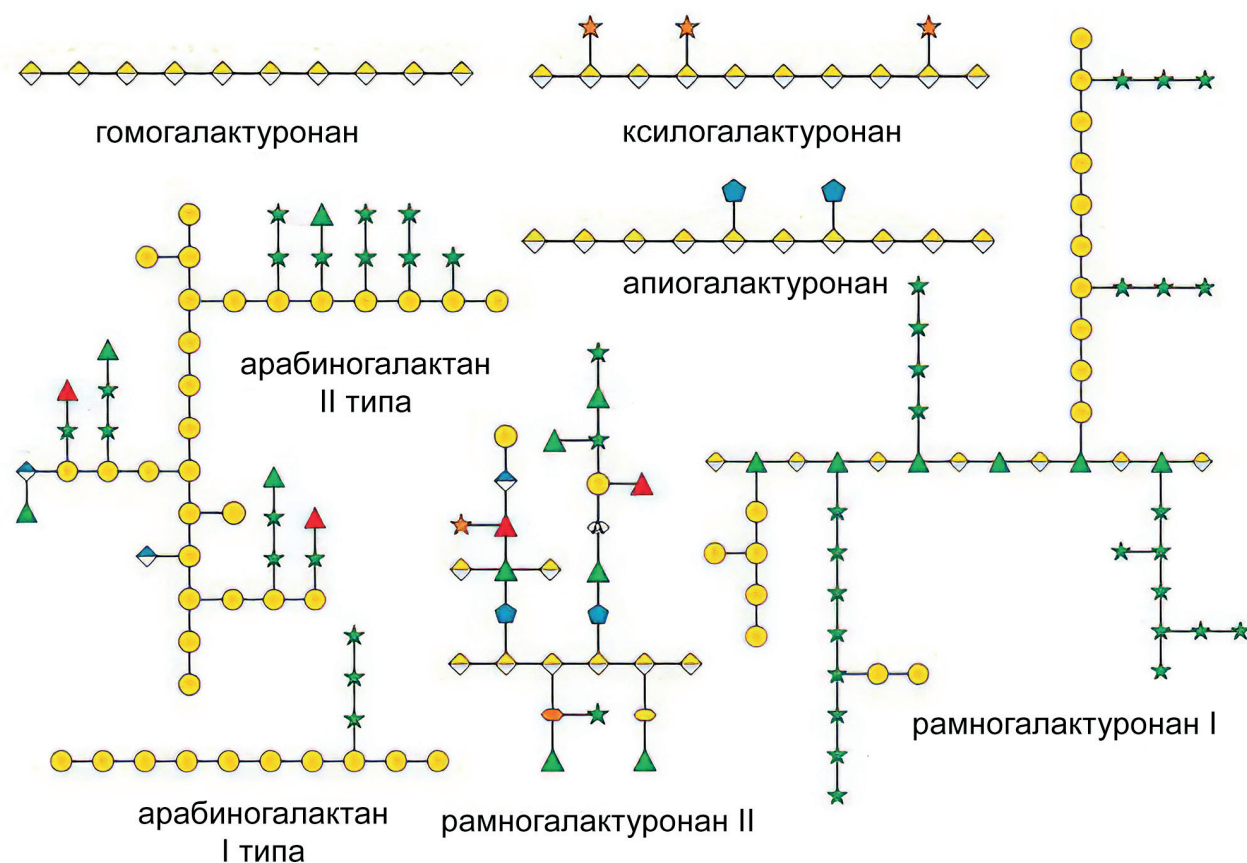
Важными структурными компонентами пектиновых полисахаридов являются остатки Gal и Ara. Они могут как входить в состав отдельных арабиногалактанов, так и формировать боковые углеводные цепи RG-I (рис. 1). В арабиногалактанах остатки Gal связаны между собой 1,3- и 1,6-связями; остатки Ara, как правило, имеют терминальное расположение; соотношение Ara/Gal варьирует от 30/70 до 40/60. Боковые цепи в RG-I формируют арабинаны с 1,5-связанными остатками Ara, доля которых в боковых цепях больше 50%, галактаны с 1,4-связанными остатками Gal, в которых доля остатков Ara незначительна [30]. Различия в составе этих полисахаридов мы характеризовали величиной суммы остатков Gal и Ara, а также соотношением Gal/Ara.

HG образует основную углеводную цепь в XGA и AGA. В XGA боковые цепи, образованные 1,2-, 1,3- и 1,4-связанными остатками Xyl, замещают остатки GalA по O-3 [31, 32]. В AGA остатки GalA могут быть замещены по O-2 и/или O-3 единичными, или несколькими 1,3-связанными остатками апиозы (Api) [33]. Степень замещения остатков GalA в AGA и XGA мы характеризовали соотношением $\text{Api}(\text{Xyl})/\text{GalA}$.

По преобладанию тех или иных структурных элементов полисахариды для гликоэрея были разделены на несколько групп (таблица). В группу 1 были объединены пектины с высокой долей HG, в которых доля остатков GalA, образующих его основную углеводную цепь, составляет $\geq 86\%$ от суммы всех моносакхаридов, и невысоким содержанием участков RG-I, а также цепей из остатков Ara и Gal. В группу 2 мы объединили пектины, в которых HG также является преобладающим доменом ($\text{GalA} \geq 50\%$), но с большим содержанием Ara и Gal, чем в полисахаридах первой группы. Группа 3, в отличие от первой и второй групп, включает пектины, содержащие RG-I, в которых доля остатков GalA и Rha, образующих его главную углеводную цепь, составляет 10–40% от суммы всех моносакхаридов. Группа 4 включает пектины, в составе которых RG-I является доминирующим компонентом, доля остатков Gal и Ara в них составляет 10–40%. Группы 5–7 включают полисахариды, в составе которых преобладают остатки Ara и Gal (40–100%); в группе 5 объединены полисахариды с высоким содержанием и остатков Ara, и Gal; в группе 6 – полисахариды с преобладанием остатков Ara; в группе 7 – остатков Gal. Замещённые галактуронаны (XGA и AGA) объединены в группу 8. Остальные 13 полисахаридов, которые в качестве доминирующего компонента содержат или галактоманнан, или арабиноксилан, или ксилан, или глюкан, или ксилоглюкан, были объединены в группу 9 и обозначены как гемицеллюлозы. Кроме перечисленных выше полисахаридов, эррей содержал 14 моносакхаридов и 9 олигосахаридов – компонентов использованных полисахаридов и/или типичных лигандов известных растительных лектинов (таблица).

Оптимизация условий иммобилизации гликанов. Для иммобилизации полисахаридов было использовано два типа активации поверхности слайда – эпоксидом или NHS-эфиром. Иммобилизацию на эпоксид-активированном слайде проводили в 300 мМ Na_2HPO_4 , содержащем неионогенный детергент Tween 20 (эти условия были рекомендованы производителем слайдов для иммобилизации олигосахаридов). Однако,

а



б

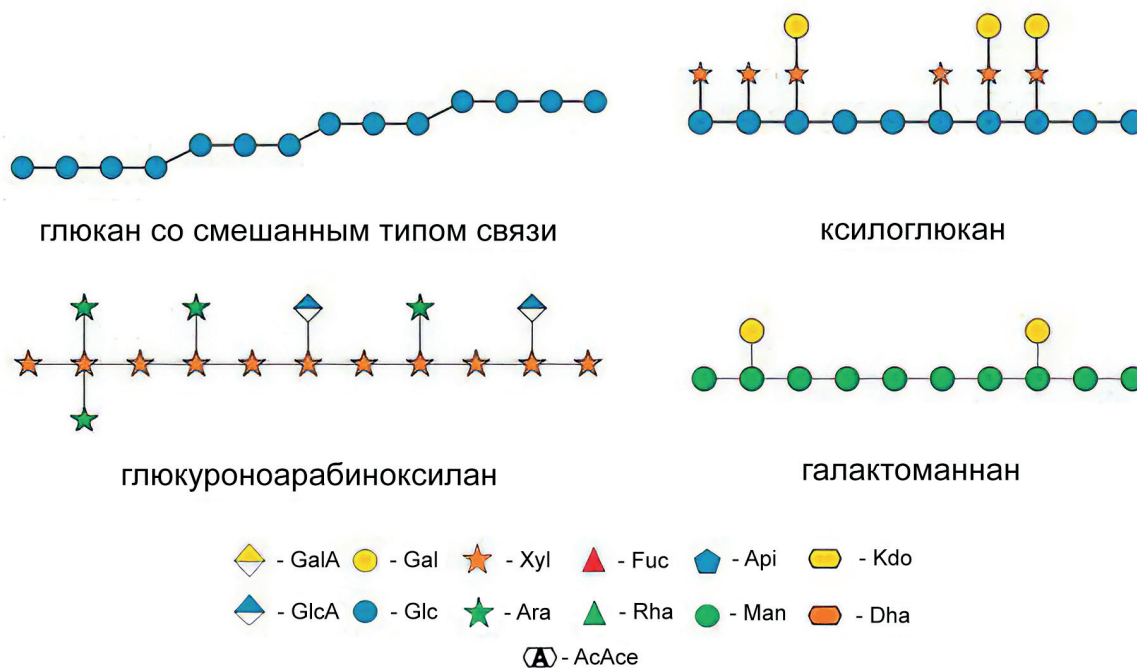


Рис. 1. Схематическое изображение фрагментов основных структурных компонентов полисахаридов клеточной стенки растений, которые вошли в состав гликоэррея: а – пектиновые полисахариды, б – гемицеллюлозы (создано с помощью ресурса DrawGlycan-SNFG [29]); более подробно символическую номенклатуру моносахаридов можно посмотреть на glycopedia.eu

Группы гликанов, составляющих гликоэпэрей

№ группы	Наименование группы полисахаридов
1	Гомогалактуронаны (HG)
2	Пектины с преобладанием HG
3	Пектины с преобладанием HG и значительной долей RG
4	Пектины с преобладанием RG
5	Полисахариды с преобладанием Ara и Gal
6	Полисахариды с преобладанием Ara
7	Полисахариды с преобладанием Gal
8	Замещённые галактуронаны (XGA, AGA)
9	Гемицеллюлозы: GAM, AX, XYL, GLC, XG

Моно- и олигосахариды

№	Структура	№	Структура
1-s	L-Fuca-sp*	39-s	Xylβ-sp
2-s	Galα-sp	40-s	Xylα-sp
3-s	Galβ-sp	97-s	Galβ1-4GlcNAcβ-sp
5-s	GalNAcα-sp	111-s	Glcβ1-4Glcβ-sp1
7-s	Glcα-sp	112-s	Glcβ1-6Glcβ-sp1
9-s	Glcβ-sp	116-s	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp
16-s	Manα-sp	504-s	(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
18-s	Manβ-sp	505-s	(GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
20-s	L-Rhaα-sp1**	627-s	(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
28-s	Xylβ-sp1	831-s	Galβ1-4Glcβ-sp
29-s	Fucβ-sp1	844-s	Xylβ1-2Manα-sp
31-s	L-Araα-sp1		

Примечание. Используемые сокращения: AGA – апиогалактуронан, AX – арабиноксиланы, GAM – галактоманнаны, GLC – глюканы, HG – гомогалактуронан, RG-I – рамногалактуронан I, XG – ксилоглюканы, XGA – ксилогалактуронан, XYL – ксиланы.

* sp – -OCH₂CH₂CH₂NH₂.

** sp1 – -NHCOCH₂NH₂. Все моносахариды являются D-пиранозами, если не указано иначе.

в отличие от олигосахаридов, для полисахаридов наблюдалось неравномерное распределение интенсивности флуоресценции (после проявки, см. раздел «Материалы и методы») внутри спота в виде «бубликов» (рис. 2). Похо-

жее явление, описанное ранее [8], объясняется неудачным сочетанием нескольких факторов, в частности скорости высыхания нанесённой капли и особенностями структуры наносимых на поверхность гликанов. Варьирование ус-

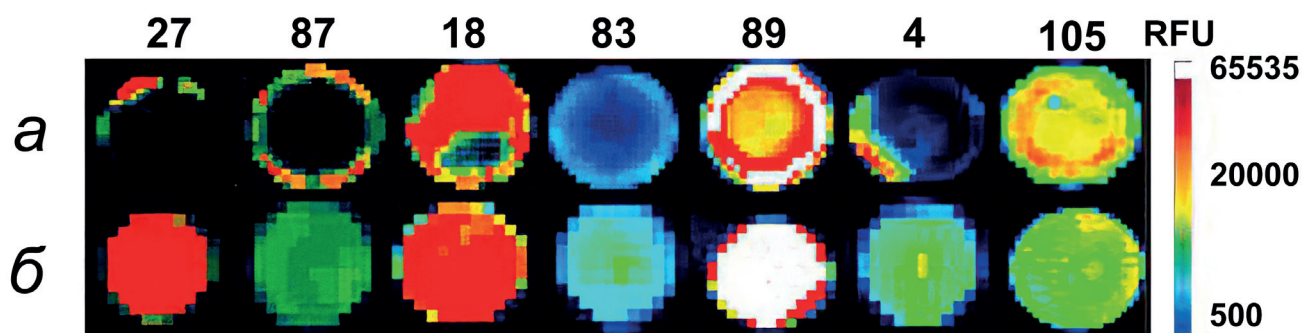


Рис. 2. Морфология спотов при различных условиях печати. *а* – Эпоксидная химия (0,001% (v/v) Tween 20), *б* – NHS-химия (0,005% CHAPS), 27–105 – номера гликанов (см. таблицу в Приложении). Представлено взаимодействие поликлональных антител человека с гликанами эррея (в радужной цветовой шкале). RFU – относительные единицы флуоресценции

ловий, в частности замена Tween 20 на цвитерионный детергент CHAPS, лишь отчасти помогло исправить ситуацию (данные не приведены). Поэтому была апробирована альтернативная химия иммобилизации – на NHS-активированных слайдах Slide H) производства «Schott Nexterion», которые более реакционно-способны, чем эпоксидные, а также содержат, как заявлено производителем, 3D-поверхностный слой полимера, который снижает скорость высыхания капли. Морфология спотов (рис. 2) при печати полисахаридов на этих слайдах оказалась приемлемой, хотя споты не всегда были одинакового диаметра, что пришлось нивелировать использованием метода подстраивающихся колец при обработке полученных изображений.

Поскольку процесс печати и иммобилизации на NHS-активированные слайды проходит при pH 8,5, была проверена устойчивость полисахаридов, содержащих остатки уроновых кислот, к деградации при таком значении pH. Для этого полисахариды растворяли в буфере для печати, выдерживали в течение 1–3 суток и оценивали содержание возможных продуктов распада спектрофотометрически. Значимой деградации полисахаридов обнаружено не было. Кроме того, из одних и тех же растворов, которые хранили при -20°C , печать производили несколько раз в течение 6 месяцев, проверяя устойчивость полисахаридов в растворе при пониженной температуре за данный промежуток времени. Во всех случаях коэффициент межслайдовой корреляции ССС (согласованный коэффициент корреляции Лина, рассчитанный как описано ранее [34]) между ними превышал 0,85, что также свидетельствует о том, что полисахариды не претерпевают значительных изменений при длительном хранении в описанных выше условиях.

Взаимодействие моноклонального антитела INRA-RU2 с полисахаридами эррея. Большинство полисахаридов эррея содержит фрагменты RG-I, поэтому для проверки факта иммобилизации полисахаридов, а также их функциональной активности было использовано моноклональное IgG-антитело INRA-RU2, узнающее неразветвленные или частично разветвленные области RG-I, а именно: два дисахаридных повтора остова; оно демонстрирует максимальное связывание с полисахаридами, в структуре которых есть семь таких повторов [21].

На нашем эррее антитело INRA-RU2 взаимодействовало с 68 из 113 напечатанных полисахаридов, в то же время, не проявляя активности по отношению к моно- и олигосахаридам (рис. 3).

Все пектины групп 3 и 4, отличающиеся значительной долей RG-I (10–55% от суммы всех моносахаридов в образцах), продемонстрировали сильное взаимодействие с антителом. Исключением являлись два пектина из картофеля (47 и 46, см. таблицу в Приложении), которые отличаются низкой молекулярной массой ($M_w = 14\text{--}16$ кДа), что, вероятно, и явилось причиной отсутствия взаимодействия. Более того, антитело взаимодействовало с большинством пектинов из групп 1 и 2, в которых RG-I идентифицирован в качестве минорного компонента (<10%); в то же время полисахариды из этих же групп, выделенные из рдеста плавающего (11), хвоща лесного (12), древесной зелени сосны сибирской (15, 16, 87) и каллусной культуры ряски малой (80, 86), в которых данный эпигенот низко представлен, с антителом не взаимодействовали, рационального объяснения чему у нас пока нет.

Корреляции между наличием взаимодействия с INRA-RU2 и содержанием RG-I в полисахаридах групп 5–7 установлено не было.

Несмотря на то что полисахариды этих групп сравнимы по содержанию Rha с группой 2, взаимодействие с антителом продемонстрировали лишь немногие из них. Наибольшее связывание с антителом выявлено для полисахаридов солодки (26, 35), сахарной свёклы (48–50) и льна (69). Тогда как для полисахаридов хвойных (104, 105) и смолёвки обыкновенной (109), сравнимых по содержанию RG-I и Mw с некоторыми полисахаридами солодки и сахарной свёклы (26, 48–50), взаимодействия с антителом не установлено. Вероятно, это обусловлено недоступностью эпитопа из-за высокой плотности боковых углеводных цепей, образованных остатками Ara и Gal, что является отличительной особенностью полисахаридов групп 5–7.

Из группы 8, объединяющей замещённые галактуронаны, доля RG-I в которых незначительна, только пектин баобаба (32) взаимодействовал с INRA-RU2, хотя среди пектинов этой группы он отличается наименьшим содержанием RG-I. Вероятно, это обусловлено низкой степенью замещения главной углеводной цепи боковыми цепями (таблица в Приложении). В пектинах из ряски и взморника (28, 30, 31) – других представителей этой группы – связывания с антителом INRA-RU2 не отмечалось, хотя доля RG-I была существенно выше, чем в пектине баобаба, а суммарное замещение остатков GalA главной углеводной цепи боковыми цепями, образованными остатками Xyl и Api, достигало 75%.

С полисахаридами группы 9, представленной гемицеллюлозами, связывания ожидаемо не наблюдалось.

Взаимодействие антител крови человека с гликанами эррея. Ещё одним способом подтверждения факта иммобилизации моно- и олигосахаридов было взаимодействие с антителами крови человека. Образец сыворотки крови условно здорового донора ожидаемо взаимодействовал с GalNAc α , L-Rha α , дисахаридами Glc β 1-6Glc β и GlcNAc β 1-4GlcNAc β [19, 20], которые (кроме рамнозы) не являются компонентами использованных полисахаридов. Изучение взаимодействия антител крови человека с растительными полисахаридами, в том числе с пектинами, ранее систематически не проводилось. Согласно полученным в нашем исследовании результатам, 74 полисахарида из 113 продемонстрировали связывание при инкубации образца сыворотки крови с эрреем (рис. 3). Профиль IgM был гораздо шире, чем IgG, однако распознаваемые этими классами иммуноглобулинов полисахариды принадлежат к одним и тем же группам пектинов, а именно:

к группам 1 и 2, содержащим HG; группам 3 и 4, содержащим RG-I; группам 5–7 со значительной долей остатков Ara и/или Gal (>45%), а также группе 9, объединяющей непектиновые полисахариды. Из группы 8 антитела обоих классов распознавали только пектин из ряски малой (29), обладающий большей молекулярной массой, чем пектин (28) из того же источника, связывания с которым не наблюдали. В топ-список самых активных взаимодействий с IgG человека попали полисахариды из групп 5 и 7, выделенные из каллусных культур смолёвки и пижмы (108–112), а максимальное связывание показал пектин (20, группа 3), выделенный из листьев сабельника болотного, со значительной долей RG-I. Максимальное взаимодействие с IgM показали полисахариды (103, 104, 106 и 107; группа 5), выделенные из древесной зелени пихты и лиственницы, со значительной долей остатков Ara и Gal, а также пектины, содержащие RG-I (группа 3 и 4), выделенные из листьев берёзы пушистой и берёзы обыкновенной (23, 25, 90, 92–94). Структурных особенностей, резко выделяющих эти полисахариды на фоне родственных, мы не идентифицировали.

Взаимодействие рицина с гликанами эррея. В качестве представителя растительных углевод-связывающих белков был взят рицин, известный как β -галактозосвязывающий лектин, который активно используют в гликобиологии для характеристики гликозилирования в первую очередь в тканях млекопитающих. Он ожидаемо провзаимодействовал с β Gal-терминированными гликанами, а также с двухантенной N-цепью комплексного типа (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1) $_2$ -3,6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β), что было найдено ранее (<http://functionalglycomics.com/>). Рицин показал значимое связывание с 23 из 113 полисахаридов (рис. 3), самые интенсивные сигналы относятся к ксилоглюканам (60, 61; группа 9) из тамаринда, содержащим остатки Gal (до 15%), входящие в состав боковых цепей (Gal β 1-2Xyl α 1-), замещающие остатки Glc глюканового остова по положению O-6 [35], а также полисахаридам со значительным содержанием остатков Ara и Gal группы 5 из акации (58), лиственницы (55) и полисахариду со значительным содержанием остатков Gal группы 7 из льна (69). Интересно, что интенсивность взаимодействия этого лектина с полисахаридами не коррелирует с содержанием остатков Gal – у топовых ксилоглюканов из тамаринда содержание остатков Gal было одним из самых низких среди 23 провзаимодействовавших полисахаридов, что свидетель-

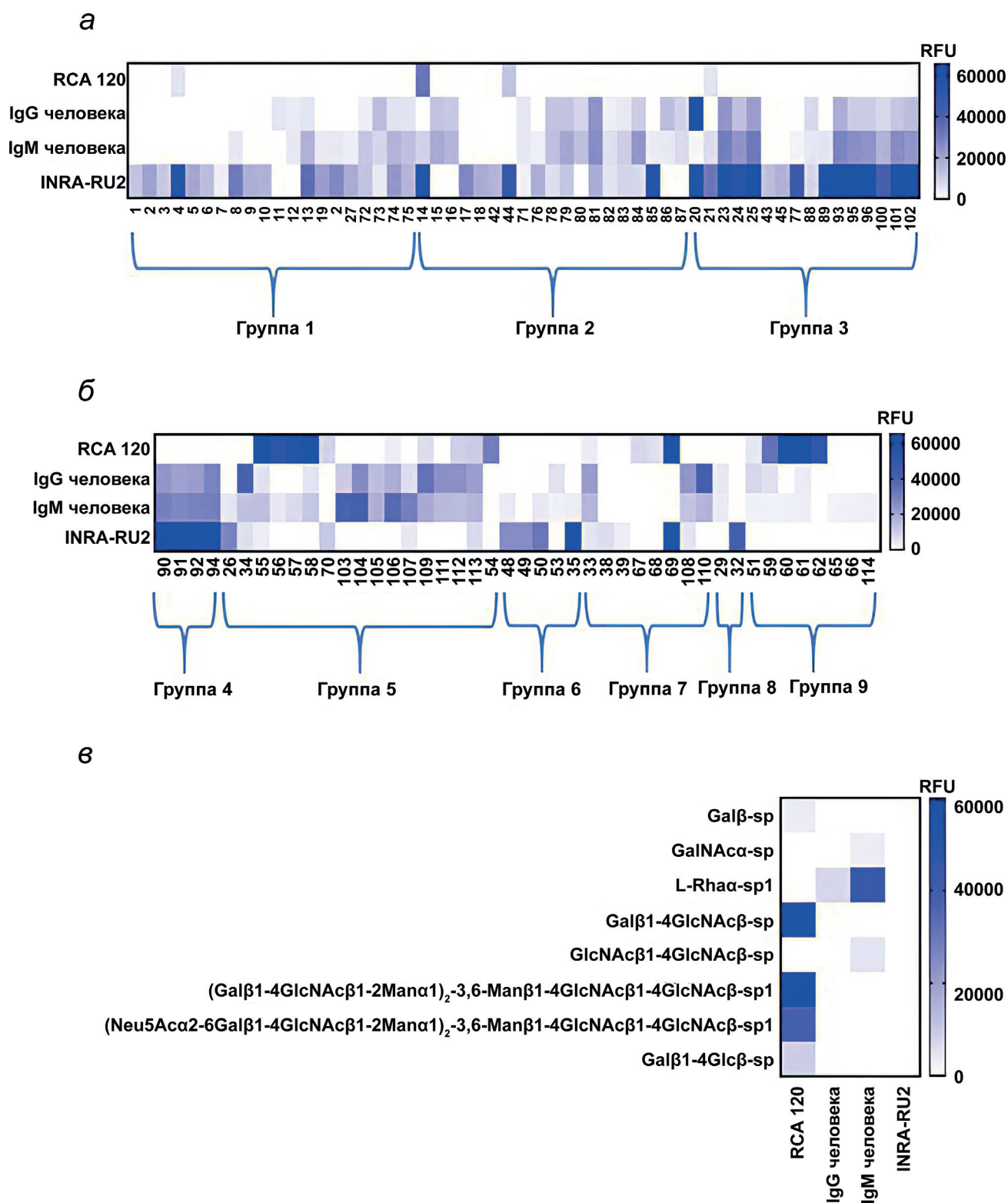


Рис. 3. Взаимодействие моноклонального антитела INRA-RU2, антител (IgG и IgM) плазмы крови человека, а также рицина (RCA 120) с гликанами эррея. *а* – Взаимодействие с пектинами групп 1–3. *б* – Взаимодействие с пектинами групп 4–8 и гемицеллюлозами группы 9. *в* – Взаимодействие с моно- и олигосахаридами (приведены только значимые взаимодействия). Приведённые по оси X номера – идентификационные номера полисахаридов. Подробное описание приведено в таблице в Приложении

ствует в пользу того, что для специфического связывания анализируемого лектина необходимо не столько количественное преобладание этого типа мономера, сколько структурные и конформационные особенности содержащего его гликтопа. Отметим, что остатки Gal полностью отсутствовали только в структуре глюкана ячменя, взаимодействия с которым мы не наблюдали (116).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Углеводы и взаимодействующие с ними белки вовлечены в большинство протекающих в растительной клетке процессов. Выяснение механизмов функционирования растительных УСБ напрямую сопряжено с необходимостью изучения их специфичности. Лидирующие позиции среди инструментов для оценки взаимодействий УСБ со специфическими гликанами занимают гликановые эрреи, успешно зарекомендовавшие себя при исследованиях УСБ животных и человека [5, 35–37], но до сих пор практически не использовавшиеся при изучении УСБ растений. В представленной работе впервые был сконструирован гликочип, одновременно содержащий охарактеризованные растительные полисахариды нескольких классов, а также ряд моно- и олигосахаридов, и изучено его взаимодействие с несколькими видами белков: 1) моноклональным антителом INRA-RU2, специфически распознающим остов RG-I; 2) растительным лектином, рицином; 3) поликлональными антителами крови человека. Указанные белки значимо взаимодействовали с 99 из 113 полисахаридов (88%). Гарантированная иммобилизация полисахаридных компонентов принципиальна — отсутствие сигнала изучаемого УСБ на эррее должно однозначно интерпретироваться как отсутствие связывания. И если для тех гликанов, которые иммобилизовали в этом формате раньше (то есть олигосахаридов и бактериальных полисахаридов, имеющих аминокгруппу), проблемы доказательства иммобилизации не стояло, то для растительных полисахаридов оно необходимо. К сожалению, универсального реагента, взаимодействующего с любым растительным полисахаридом, не существует. Тем не менее представленные данные подтверждают наличие большинства полисахаридов на поверхности использованного слайда. Каждый из тех полисахаридов, связывание УСБ с которыми мы не увидели, имеет близкого «родственника» с точки зрения химической структуры среди связавшихся, поэтому у нас нет основа-

ний опасаться, что «молчащие» полисахариды не иммобилизовались. Тем не менее мы пока не можем утверждать, что в предложенных условиях будет иммобилизоваться любой полисахарид — в природе есть такие, в структуре которых полностью отсутствуют первичные (наиболее реакционноспособные) гидроксильные, а вторичные — слабо нуклеофильны или затруднены из-за экранирования соседними молекулярными фрагментами; поэтому в дальнейшем мы будем уделять особенное внимание такого рода молекулам.

Приведённые выше экспериментальные данные по связыванию изученных белков с растительными полисахаридами важны не только как доказательство факта иммобилизации последних, но, безусловно, имеют самостоятельное значение в плане характеристики или более детального (чем раньше) изучения этих белков. Ниже полученные результаты обсуждены именно с точки зрения изучения специфичности этих УСБ.

Рицин состоит из двух полипептидных цепей, одна из которых является токсином, а вторая — галактозосвязывающим лектином [38]. Биологические функции рицина как целого, так и его лектинового домена до сих пор лишь предполагаются. В самом общем виде лектиновому домену отводят функцию вектора, доставляющего токсинную активность в нужное место, а в целом роль рицина связывают с защитой от насекомых и других патогенов [2, 38]. С другой стороны, для лектинового домена не исключена роль якоря для депонирования и транспорта всего белка за счёт взаимодействия с собственными полисахаридами растительной клетки. До настоящего исследования такая вспомогательная («технологическая») функция оставалась лишь гипотетической, однако теперь, когда показано связывание рицина с растительными полисахаридами, приобретает смысл развитие этой гипотезы.

Антитела крови человека. Известно, что в крови человека детектируются антитела к полисахаридам бактериального происхождения, что можно объяснить двумя факторами. Во-первых, тем, что это адаптивные иммуноглобулины, которые генерируются В2-лимфоцитами под действием попадающих в организм инфекционных бактерий, либо под действием вакцин [39, 40]. Во-вторых, тем, что это естественные (врождённые) антитела, имеющие паратоп для узнавания комменсальной микробиоты, необходимый для начала функционирования (прайминга) В1-лимфоцитов в первые месяцы жизни [41]. Обнаруженное в данной работе широко представленное (то есть, оче-

видно, неслучайное) взаимодействие с растительными полисахаридами не укладывается ни в одно из этих двух объяснений; также, не представляется убедительным и перекрёстное взаимодействие бактериальных полисахаридов с пектинами растений, особенно в свете того, что исследуемые антитела не способны взаимодействовать даже с фрагментами использованных полисахаридов (также присутствующих в эррее). В то же время в литературе описаны так называемые пектин-полисахарид-реактивные антитела человека (принадлежащие к классам M, G и A, особенно IgM и IgG) [42–44], способные узнавать, например, арабинан свёклы, арабиногалактан из сои и гуммиарабика, полигалактуроновую кислоту из цитрусовых, а также некоторые разветвлённые рамногалактуронаны I. С одной стороны, постоянный контакт человека с растительными полисахаридами пищи предполагает возможность узнавания их как антигенов, с другой стороны, смысл формирования таких антител неясен. Отметим, однако, что пектины рассматривают как триггеры аллергических реакций на орехи и фрукты [45, 46]. Так или иначе, обнаруженное взаимодействие антител крови человека с разнообразными пектинами требует дальнейшего изучения.

Моноклональное антитело INRA-RU2 узнаёт остов RG-I, сформированный как минимум из двух повторяющихся дисахаридных звеньев Rha-GalA [21]. Полученное против RG-I слизи семян *Arabidopsis thaliana* антитело способно распознавать свой эпитоп и в других растительных объектах. Полученные с помощью эррея результаты подтвердили эту способность. Кроме того, было обнаружено, что на взаимодействие антитела с полисахаридами влияет не только количество доменов RG-I, но и присутствие в полисахаридах других структурных элементов, таких как замещённые галактуронаны, а также присутствие полисахаридов с остатками Ara и Gal, характерными для боковых цепей RG-I (группы 5–8). Это может свидетельствовать о том, что для взаимодействия INRA-RU2 критичны тонкие нюансы в строении боковых цепей полисахаридов и/или их расположение, а также, возможно, и пространственное расположение различных структурных элементов пектиновых макромолекул относительно друг друга. В то же время нельзя исключить и конформационных изменений некоторых из пектиновых макромолекул при их иммобилизации. Обнаруженные факты предполагают необходимость более детального изучения структуры и конформационных особенностей пектинов.

Таким образом, гликоэррей, сочетающий в себе гликаны разного размера — от моно- до полисахаридов — позволяет шире взглянуть на специфичность УСБ из совершенно различных источников, изучать потенциальные мишени уже известных лектинов, а также, как мы ожидаем, исследовать специфичность новых белков, идентифицированных пока только *in silico*.

Вклад авторов. Т.А. Горшкова, Н.В. Бовин — постановка проблемы и руководство работой; Н.В. Шилова — разработка концепции статьи, формирование и обсуждение результатов исследования; А.Н. Никифорова — проведение экспериментов, описание и графическое представление результатов, оформление статьи; В.В. Головченко, О.А. Патова, П.В. Микшина — получение, очистка, фракционирование и характеристика образцов полисахаридов, оформление результатов в этой части исследования, обсуждение и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (гранты № 20-63-47110 (печать и работа с гликоэрреями) и № 20-64-47036 (очистка, разделение и характеристика полисахаридов)), а также Госзадания № АААА-А18-118022790083-9 (подбор базы коммерческих полисахаридов).

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в обсуждении результатов и подготовке материалов статьи Л.В. Козловой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН), а также А.Ф. Ахметгалиевой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН) за техническое сопровождение работ по подготовке отдельных коммерческих полисахаридов. Мы хотели бы выразить благодарность доктору Мари-Кристин Рале и доктору Фабьен Гийон (Французский национальный институт сельскохозяйственных исследований, Нант, Франция) за любезно предоставленный образец антитела INRA-RU2, а также доктору Е.А. Гюнтер (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН) за любезно предоставленные образцы полисахаридов, выделенных из каллусных культур.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Coninck, T., and Van Damme, E. J. M. (2021) Review: the multiple roles of plant lectins, *Plant Sci.*, **313**, 111096, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111096.
2. Vandenborre, G., Smagghe, G., and Van Damme, E. J. M. (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects, *Phytochemistry*, **72**, 1538-1550, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.024.
3. De Paz, J. L., and Seeberger, P. H. (2012) In *Carbohydrate Microarrays: Methods and Protocols* (Chevolot, Y., eds) Humana Press, NJ, pp. 1-12.
4. Ratner, D. M., Adams, E. W., Disney, M. D., and Seeberger, P. H. (2004) Tools for glycomics: Mapping interactions of carbohydrates in biological systems, *ChemBioChem*, **5**, 1375-1383, doi: 10.1002/cbic.200400106.
5. Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M. E., Alvarez, R., et al. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17033-17038, doi: 10.1073/pnas.0407902101.
6. Shilova, N., Huflejt, M. E., Vuskovic, M., Obukhova, P., et al. (2013) In *SialoGlyco Chemistry and Biology I. Topics in Current Chemistry* (Gerardy-Schahn, R., Philippe Delannoy, P., von Itzstein, M., eds) Springer Berlin, Heidelberg, pp. 169-181.
7. Ribeiro, D. O., Pinheiro, B. A., Carvalho, A. L., and Palma, A. S. (2017) In *Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches* (Rauter, A., Lindhorst, T., Queneau, Y., eds) CPI Group Ltd, UK, pp. 159-176.
8. Song, X., Heimburg-Molinaro, J., Cummings, R. D., and Smith, D. F. (2014) Chemistry of natural glycan microarrays, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **18**, 70-77, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.01.001.
9. Sørensen, I., Pedersen, H. L., and Willats, W. G. T. (2009) An array of possibilities for pectin, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1872-1878, doi: 10.1016/j.carres.2008.12.008.
10. Pedersen, H. L., Fangel, J. U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M. G., et al. (2012) Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research, *J. Biol. Chem.*, **287**, 39429-39438, doi: 10.1074/jbc.M112.396598.
11. Øbro, J., Sørensen, I., Møller, I., Skjøt, M., Mikkelsen, J. D., et al. (2007) High-throughput microarray analysis of pectic polymers by enzymatic epitope deletion, *Carbohydr. Polymers*, **70**, 77-81, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.03.008.
12. Moore, J. P., Nguema-Ona, E., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Hugo, A., et al. (2014) Profiling the main cell wall polysaccharides of grapevine leaves using high-throughput and fractionation methods, *Carbohydr. Polymers*, **99**, 190-198, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.013.
13. Kračun, S. K., Fangel, J. U., Rydahl, M. G., Pedersen, H. L., Vidal-Melgosa, S., et al. (2017) In *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics* (Lauc, G., Wuhler, M., eds) Humana Press, NY, pp. 147-165.
14. Sillo, F., Fangel, J. U., Henrissat, B., Faccio, A., Bonfante, P., et al. (2016) Understanding plant cell-wall remodelling during the symbiotic interaction between *Tuber melanosporum* and *Corylus avellana* using a carbohydrate microarray, *Planta*, **244**, 347-359, doi: 10.1007/s00425-016-2507-5.
15. Salmeán, A. A., Guillouzo, A., Duffieux, D., Jam, M., Matard-Mann, M., et al. (2018) Double blind microarray-based polysaccharide profiling enables parallel identification of uncharacterized polysaccharides and carbohydrate-binding proteins with unknown specificities, *Sci. Rep.*, **8**, 2500, doi: 10.1038/s41598-018-20605-9.
16. García Caballero, G., Beckwith, D., Shilova, N. V., Gabba, A., Kutzner, T. J., et al. (2020) Influence of protein (human galectin-3) design on aspects of lectin activity, *Histochem. Cell Biol.*, **154**, 135-153, doi: 10.1007/s00418-020-01859-9.
17. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Knirel, Y., Obukhova, P., et al. (2021) Specificity profile of α Gal antibodies in α GalT KO mice as probed with comprehensive printed glycan array: comparison with human anti-Galili antibodies, *Xenotransplantation*, **28**, e12672, doi: 10.1111/xen.12672.
18. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Antipova, N., Obukhova, P., et al. (2020) Human natural antibodies recognizing glycan Gal β 1-3GlcNAc (LeC), *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6511, doi: 10.3390/ijms21186511.
19. Huflejt, M. E., Vuskovic, M., Vasiliu, D., Xu, H., Obukhova, P., et al. (2009) Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges, *Mol. Immunol.*, **46**, 3037-3049, doi: 10.1016/j.molimm.2009.06.010.
20. Bovin, N. V. (2013) Natural antibodies to glycans, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 786-797, doi: 10.1134/S0006297913070109.
21. Ralet, M.-C., Tranquet, O., Poulain, D., Moïse, A., and Guillon, F. (2010) Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone, *Planta*, **231**, 1373-1383, doi: 10.1007/s00425-010-1116-y.
22. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356, doi: 10.1021/ac60111a017.
23. Usov, A. I., Bilan, M. I., and Klochkova, N. G. (1995) Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae), *Bot. Marina*, **38**, 43-51, doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43.

24. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
25. Wood, P. J., and Siddiqui, I. R. (1971) Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity, *Anal. Biochem.*, **39**, 418-428, doi: 10.1016/0003-2697(71)90432-5.
26. Golovchenko, V. V., Khramova, D. S., Shashkov, A. S., Otgonbayar, D., Chimidsogzol, A., et al. (2012) Structural characterisation of the polysaccharides from endemic Mongolian desert plants and their effect on the intestinal absorption of ovalbumin, *Carbohydr. Res.*, **356**, 265-272, doi: 10.1016/j.carres.2012.03.023.
27. Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **57**, 929-967, doi: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3.
28. Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., and Schols, H. A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls, *Struct. Chem.*, **20**, 263, doi: 10.1007/s11224-009-9442-z.
29. Cheng, K., Zhou, Y., and Neelamegham, S. (2016) DrawGlycan-SNFG: a robust tool to render glycans and glycopeptides with fragmentation information, *Glycobiology*, **27**, 200-205, doi: 10.1093/glycob/cww115.
30. Горшкова Т. А. (2007) *Растительная клеточная стенка как динамичная система*, Наука, Москва.
31. Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J. (2006) Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase, *Carbohydr. Polymers*, **65**, 495-503, doi: 10.1016/j.carbpol.2006.02.015.
32. Patova, O. A., Luanda, A., Paderin, N. M., Popov, S. V., Makangara, J. J., et al. (2021) Xylogalacturonan-enriched pectin from the fruit pulp of *Adansonia digitata*: structural characterization and antidepressant-like effect, *Carbohydr. Polymers*, **262**, 117946, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117946.
33. Golovchenko, V. V., Ovodova, R. G., Shashkov, A. S., and Ovodov, Y. S. (2002) Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **60**, 89-97, doi: 10.1016/S0031-9422(02)00040-7.
34. Lin, L. I.-K. (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility, *Biometrics*, **45**, 255-268, doi: 10.2307/2532051.
35. Flannery, A., Gerlach, J., Joshi, L., and Kilcoyne, M. (2015) Assessing bacterial interactions using carbohydrate-based microarrays, *Microarrays*, **4**, 690-713, doi: 10.3390/microarrays4040690.
36. Laurent, N., Voglmeir, J., and Flitsch, S. L. (2008) Glycoarrays – tools for determining protein-carbohydrate interactions and glycoenzyme specificity, *Chem. Commun.*, **37**, 4400-4412, doi: 10.1039/b806983m.
37. Puvirajesinghe, T., and Turnbull, J. (2016) Glycoarray technologies: deciphering interactions from proteins to live cell responses, *Microarrays*, **5**, 3, doi: 10.3390/microarrays5010003.
38. Polito, L., Bortolotti, M., Battelli, M., Calafato, G., and Bolognesi, A. (2019) Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin, *Toxins*, **11**, 324, doi: 10.3390/toxins11060324.
39. Janssen, L. M. A., Heron, M., Murk, J.-L., Leenders, A. C. A. P., Rijkers, G. T., et al. (2021) The clinical relevance of IgM and IgA anti-pneumococcal polysaccharide ELISA assays in patients with suspected antibody deficiency, *Clin. Exp. Immunol.*, **205**, 213-221, doi: 10.1111/cei.13605.
40. Campanero-Rhodes, M. A., Palma, A. S., Menéndez, M., and Solís, D. (2020) Microarray strategies for exploring bacterial surface glycans and their interactions with glycan-binding proteins, *Front. Microbiol.*, **10**, 2909, doi: 10.3389/fmicb.2019.02909.
41. Khasbiullina, N. R., Shilova, N. V., Navakouski, M. J., Nokel, A. Y., Blixt, O., et al. (2019) The repertoire of human antiglycan antibodies and its dynamics in the first year of life, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 608-616, doi: 10.1134/S0006297919060038.
42. Yamada, H., Kiyohara, H., and Matsumoto, T. (2003) In *Advances in Pectin and Pectinase Research* (Voragen, F., Schols, H., Visser, R., eds) Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 481-490.
43. Paulsen, B. S., and Barsett, H. (2005) In *Polysaccharides I* (Heinze, T., eds) Springer Berlin, Heidelberg, pp. 69-101.
44. Kiyohara, H., Matsumoto, T., Nagai, T., Kim, S.-J., and Yamada, H. (2006) The presence of natural human antibodies reactive against pharmacologically active pectic polysaccharides from herbal medicines, *Phytomedicine*, **13**, 494-500, doi: 10.1016/j.phymed.2005.09.004.
45. Washio, K., Nakamura, M., Sato, N., Hori, M., Matsubara, K., et al. (2022) Anaphylaxis in a pectin- and cashew nut-allergic child caused by a citrus bath, *Allergol. Int.*, **71**, 155-157, doi: 10.1016/j.alit.2021.07.006.
46. Capucilli, P., Kennedy, K., Kazatsky, A. M., Cianferoni, A., and Spergel, J. M. (2019) Fruit for thought: anaphylaxis to fruit pectin in foods, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, **7**, 719-720, doi: 10.1016/j.jaip.2018.11.047.

PLANT POLYSACCHARIDE ARRAY FOR STUDYING OF CARBOHYDRATE-BINDING PROTEINS

A. V. Nikiforova^{1*}, V. V. Golovchenko², P. V. Mikshina³, O. A. Patova²,
T. A. Gorshkova³, N. V. Bovin¹, and N. V. Shilova¹

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; e-mail: nikiforovaalica@gmail.com*

² *Institute of Physiology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 167982 Syktyvkar, Russia*

³ *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, 420111 Kazan, Russia*

The specificity of the most plant carbohydrate-binding proteins has either not been studied or characterized to a limited extent, many of which are known only through bioinformatic analysis of the genome. The task of deciphering the carbohydrate specificity of proteins can be solved by glycoarrays composed of many tens or even hundreds of glycans deposited on a surface the size of an microscope glass. Plant polysaccharides are the most natural ligands for studying plant proteins; the present work shows that plant polysaccharides without additional modification are immobilized on the surface, the carboxyl groups of which are activated with N-hydroxysuccinimide. As a result, an array was constructed consisting of 113 well-characterized polysaccharides isolated from the cell walls of various plants, 23 mono- and oligosaccharides – components of the studied polysaccharides, as well as glycans – ligands of widely known plant lectins. Upon chemical immobilization of polysaccharides, their functional activity was preserved, which follows from the results of interaction with antibodies and the plant lectin ricin. Using the proposed array, a previously unknown ability of ricin to bind polysaccharides was found, which significantly expands the idea of its specificity, and it was also found that antibodies to plant polysaccharides are present in human peripheral blood.

Keywords: carbohydrate-binding proteins, plant lectins, plant polysaccharides, pectins, polysaccharide chip, glycoarray, INRA-RU2, anti-glycan human antibodies

УДК 577.112

АГОНИСТЫ В ВЫТЯНУТОЙ КОНФОРМАЦИИ СТАБИЛИЗИРУЮТ АКТИВИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЕ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

© 2022 А.В. Ефимов^{1*}, О.В. Мещерякова², А.Г. Рязанов³

¹ Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: efimov@protres.ru

² Институт биологии КарНЦ РАН, 185910 Петрозаводск, Россия

³ Медицинская школа имени Рутгерса Роберта Вуда Джонсона, кафедра фармакологии,
08854 Пискатауэй, Нью-Джерси, США

Поступила в редакцию 21.03.2022

После доработки 21.06.2022

Принята к публикации 21.06.2022

В настоящей работе проведён сравнительный анализ структур агонистов и антагонистов, их взаимодействий с трансмембранными (ТМ) β -адренорецепторами, а также предложен механизм активации этих рецепторов. Характерной особенностью молекулы агониста и антагониста является то, что она имеет гидрофобную «головку» (чаще всего это одно или два ароматических кольца) и «хвостик» с положительно заряженной аминогруппой. Во всех агонистах β -адренорецепторов между ароматическим кольцом «головки» и атомом азота аминогруппы находятся два атома углерода. В молекулах антагонистов это расстояние уменьшено или увеличено до четырёх атомов за счёт дополнительных атомов углерода и кислорода. «Головка» агониста, как правило, имеет два донора или акцептора водородных связей в *para*- и *meta*-положениях ароматических колец. В «головке» антагониста таких доноров/акцепторов нет или они находятся в неподходящих положениях. Как показывает анализ известных пространственных структур комплексов агонистов и β -адренорецепторов, «головка» агониста образует две водородные связи со спиралью ТМ5, а «хвостик» образует ионную связь с остатком аспарагиновой кислоты D3.32 спирали ТМ3 и одну или две Н-связи со спиралью ТМ7. «Хвостик» антагониста может образовывать аналогичные связи, однако его «головка» и спираль ТМ5 взаимодействуют намного слабее. В результате этих взаимодействий молекула агониста приобретает вытянутую конформацию в виде «натянутой струны», в отличие от молекулы антагониста, которая имеет более длинный, изогнутый и гибкий «хвостик». «Натянутая струна» агониста взаимодействует со спиралью ТМ6 (прежде всего с остатком триптофана W6.48) и поворачивает её, что приводит к открыванию центра связывания G-белка на внутриклеточной стороне рецептора. Гибкая и большая по размерам молекула антагониста такого эффекта не оказывает.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: β -адренорецептор, GPCR, агонист, антагонист, механизм активации.

DOI: 10.31857/S0320972522070089, **EDN:** AVYRMR

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы, сопряжённые с G-белком (G-protein coupled receptor, GPCR), образуют самое большое семейство клеточных мембранных рецепторов, включающее только у человека более 800 белков, которые являются мишенями по крайней мере 30% современных лекарственных препаратов [1, 2]. В связи с этим GPCR ак-

тивно исследуются на протяжении нескольких последних десятилетий, хорошо изучены многие аспекты их биологии, биохимии и фармакологии [1–3]. Первоначально поведение GPCR описывалось простой двухстадийной моделью. Однако растущее число новых данных указывает на то, что GPCR не являются «молекулярными переключателями» («molecular switches»), а представляют собой «молекулярные передатчики» («molecular relays»), т.е. белки с множественными промежуточными стадиями между активными и неактивными состояниями [4–8].

Полученные кристаллографические данные позволяют изучить структуры как ак-

Принятые сокращения: ТМ – трансмембранные; β -AR – β -адренорецептор; GPCR – рецептор, сопряжённый с G-белком.

* Адресат для корреспонденции.

тивных, так и неактивных функциональных состояний GPCR [9, 10]. Структуры GPCR, разрешённые к настоящему времени, имеют одинаковую укладку пучка из семи трансмембранных (ТМ) α -спиралей с тремя внешними и тремя внутриклеточными петлями. Внеклеточная часть рецептора является участком, ответственным за связывание лигандов, в то время как внутриклеточная область рецептора взаимодействует с G-белками, β -аррестинами и другими эффекторами. Анализ известных структур показывает, что в процессе активации рецептора небольшие изменения взаимного расположения участков трансмембранных спиралей во внеклеточной части приводят к существенным изменениям расположения участков спиралей на цитоплазматической стороне [11–12]. Связывание агониста во внеклеточном сайте связывания рецептора приводит к открытию внутриклеточной области связывания G-белка, что, в свою очередь, обеспечивает активацию G-белка (освобождению GDP) и инициирует сигнальный каскад.

Прогресс в кристаллографии мембранных белков и связанных с ней методов в последнее десятилетие [7, 13] пролил свет на многие аспекты структуры, активации и физиологии рецепторов, однако некоторые детали механизма узнавания лигандов и активации рецепторов до сих пор непонятны. Одной из главных целей данной работы является анализ структуры лигандов β -адренорецепторов (β -AR) и их комплексов с рецепторами. Результаты этого исследования позволяют заключить, что молекулы агонистов приобретают вытянутую конформацию в виде «натянутой струны» и стабилизируют β -адренорецепторы в активированном состоянии, а молекулы антагонистов, которые имеют более длинные и гибкие «хвостики», такого эффекта не оказывают.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе основными методами исследования были стереохимический анализ известных пространственных структур комплексов β -адренорецепторов с соответствующими лигандами и сравнительный анализ химической структуры агонистов и антагонистов и их конформаций в комплексах. Для этого была создана база данных таких комплексов, которая включает 64 структуры, установленные методами кристаллографии к настоящему времени. Кроме того, была собрана база данных β -адренорецепторов, включающая экспериментально подтверждённые последова-

тельности, взятые из Swiss-ProtUniProt [14]. Координаты атомов комплексов рецепторов с лигандами были взяты из Банка белковых структур (PDB, URL: <https://www.rcsb.org>) [15]. Анализ пространственных структур рецепторов и их лигандов проводился визуально с помощью программ молекулярной графики RasMol [16] и PyMOL (версия 1.4.1 Schrödinger, LLC). Для обозначения подтипов β -адренорецепторов использовалась номенклатура, рекомендованная Комитетом NC-IUPHAR по адренорецепторам. Для маркировки аминокислотных остатков в β -адренорецепторах была использована номенклатура, предложенная Ballesteros и Weinstein [17] специально для рецепторов. Множественное выравнивание последовательностей аминокислот проводилось с помощью программы Clustal Omega (версия 1.2.4) на платформе UniProt [14]. Изображения структур молекул лигандов были взяты на порталах Drug Information Portal, ChEBI и ChemSpider.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ химической структуры лигандов β -адренорецепторов. Лиганды GPCR-рецепторов в зависимости от эффективности активации могут быть разделены на 4 группы: полные или частичные агонисты, которые обеспечивают, соответственно, максимальный или частичный функциональный ответ; обратные агонисты, которые уменьшают базовую активность рецептора (активность в отсутствие лиганда) и антагонисты, которые конкурируют с другими лигандами за центр связывания, однако не вызывают связывание G-белка.

В табл. 1 представлены химические структуры агонистов β -адренорецепторов, которые к настоящему времени закристаллизованы в комплексах с рецепторами. Характерная особенность этих молекул состоит в том, что каждая из них имеет ароматическую «головку» и «хвостик». «Хвостик» агониста всегда состоит из этаноламина, имеет положительно заряженную аминогруппу, может иметь различные заместители, связанные с аминогруппой. Гидроксильные группы, расположенные в *пара*- и *мета*-положениях катехольной «головки» агонистов, а также гидроксильные группы в *пара*-положении у агонистов некатехольного типа могут образовывать водородные связи со спиралью рецепторов.

Ароматические кольца некатехольного типа могут иметь и другие доноры/акцепторы Н-связей, которые также могут принимать

Таблица 1. Агонисты β-адренорецепторов (β-AR), для которых получены кристаллические структуры комплексов рецептора с лигандом

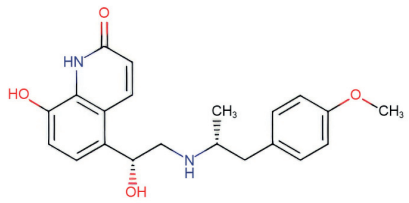
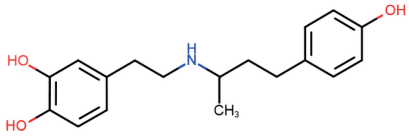
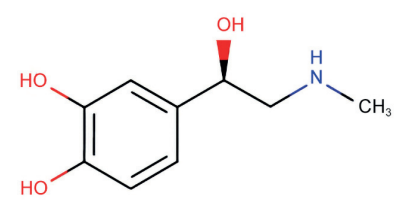
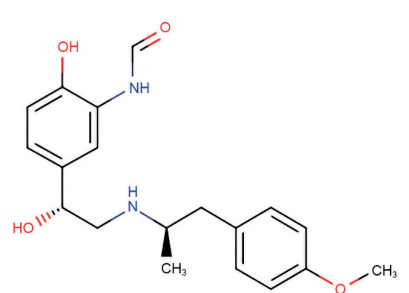
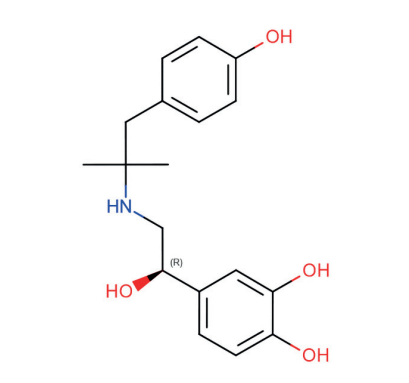
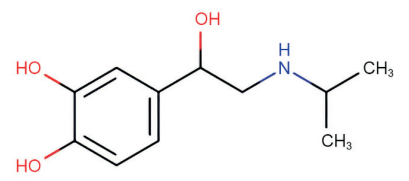
Агонист	Структура	β-AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
Carmoterol		β ₁ -AR, индейка	2Y02	2,60	[18]
Dobutamine		β ₁ -AR, индейка	2Y00	2,50	[18]
			6H7L	2,70	[19]
Epinephrine		β ₁ -AR, человек	4LDO	3,20	[20]
		β ₂ -AR, человек	7BTS	3,13	[21]
Formoterol		β ₁ -AR, индейка	6IBL 6TKO	2,70 3,30	[22]
		β ₂ -AR, человек	7BZ2	3,82	[23]
Hydroxybenzyl- isoproterenol		β ₂ -AR, человек	4LDL	3,10	[20]
Isoprenaline		β ₁ -AR, индейка	2Y03	2,85	[18]
			6H7J	2,80	[19]
		β ₂ -AR, человек	7DHR	3,80	[24]

Таблица 1 (окончание)

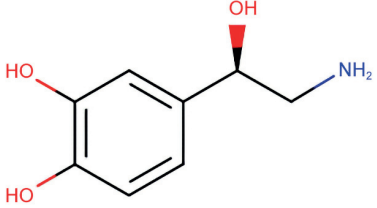
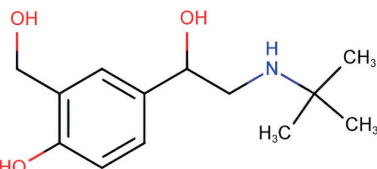
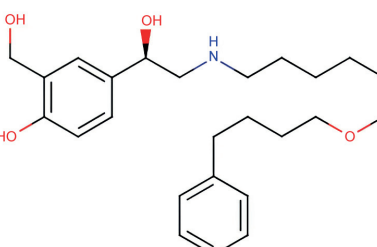
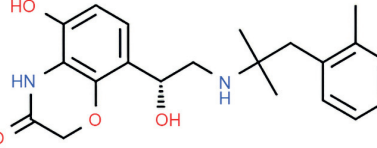
Агонист	Структура	β -AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
Noradrenaline		β_1 -AR, человек	7BU6	2,70	[21]
Salbutamol		β_1 -AR, индейка	6H7M	2,76	[19]
			2Y04	3,05	[18]
		β_2 -AR, человек	7DHI	3,26	[24]
Salmeterol		β_2 -AR, человек	6MXT	2,96	[25]
BI167107(Q27464220)		β_1 -AR, человек	7BU7	2,60	[21]
		β_2 -AR, человек	4LDE	2,79	[20]
			3P0G 3SN6	3,50 3,20	[26]
			6N48	3,20	[27]

Таблица 2. Блокаторы β -адренорецепторов (частичные агонисты, антагонисты и обратные агонисты), для которых получены кристаллические структуры комплексов рецептора с лигандом

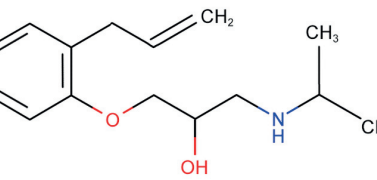
Блокатор	Структура	β -AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
Alprenolol		β_2 -AR, человек	3NYA	3,16	[29]
			6PS2 6PRZ	2,40 2,80	[30]
			6OBA	3,10	[31]

Таблица 2 (продолжение)

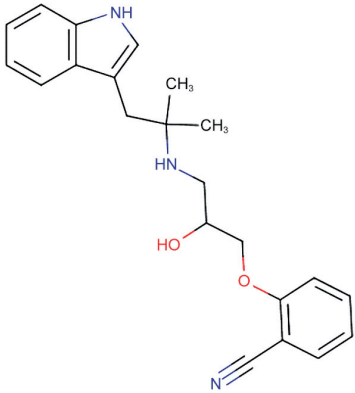
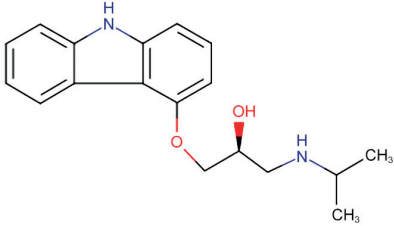
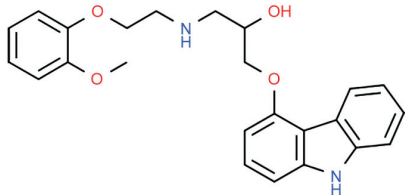
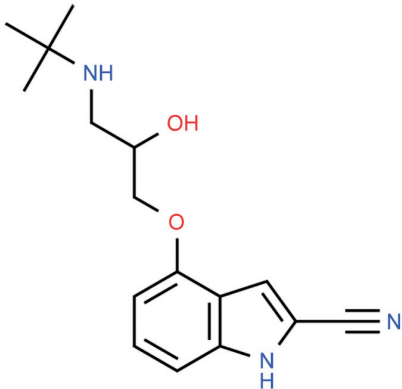
Блокатор	Структура	β -AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
Bucindolol		β_1 -AR, индейка	4AMI	3,20	[32]
Carazolol		β_1 -AR, человек	7BVQ	2,50	[21]
		β_1 -AR, индейка	2YCW	3,00	[33]
		β_2 -AR, человек	2R4R 2R4S	3,40	[34]
			2RH1	2,40	[35]
			4GBR	3,99	[36]
			5D5A 5D5B	2,48 3,80	[37]
			5JQH	3,20	[38]
6PS0	3,40	[30]			
Carvedilol		β_1 -AR, индейка	4AMJ	2,30	[32]
		β_2 -AR, человек	6PS3	2,50	[30]
Cyanopindolol		β_1 -AR, индейка	2VT4	2,70	[39]
			2YCX 2YCY	3,25 3,15	[33]
			4BVN	2,10	[40]
			5F8U	3,35	[41]
			6H7O	2,80	[19]

Таблица 2. (продолжение)

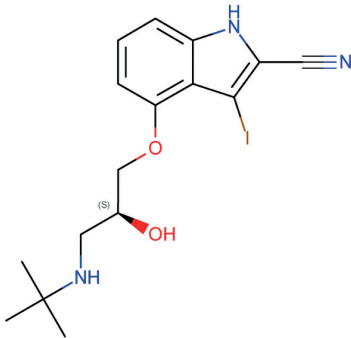
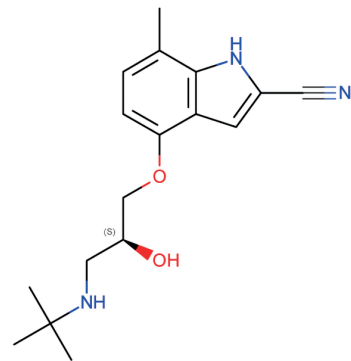
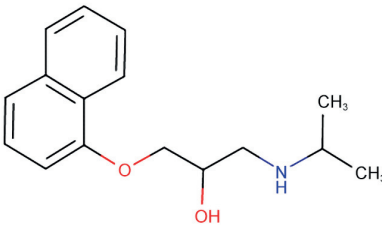
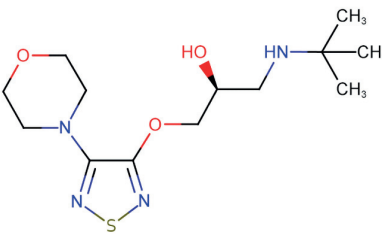
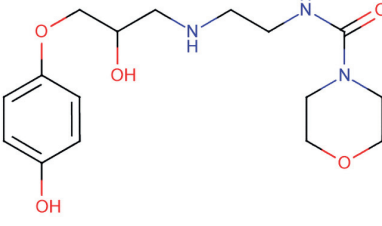
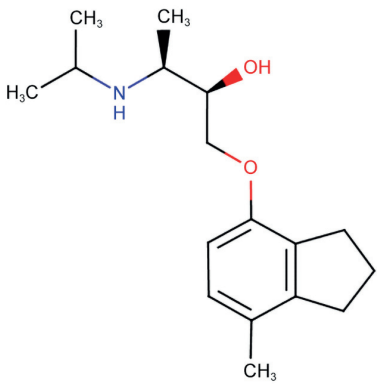
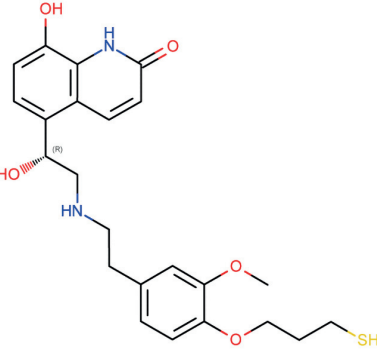
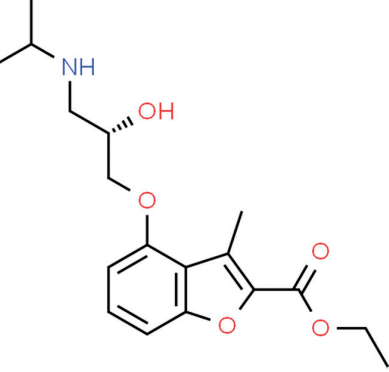
Блокатор	Структура	β -AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
Iодоцианопиндолол		β_1 -AR, индейка	2YCZ	3,65	[33]
7-Methylcyano-pindolol		β_1 -AR, индейка	5A8E	2,40	[42]
Propranolol		β_2 -AR, человек	6PS5	2,90	[30]
Timolol		β_2 -AR, человек	3D4S	2,80	[43]
			6PS1 6PS6	3,20 2,70	[30]
Xamoterol		β_1 -AR, индейка	6H7N	2,50	[19]

Таблица 2 (окончание)

Блокатор	Структура	β -AR, организм	PDB код	Разрешение, Å	Источник
ICI-118,551		β_2 -AR, человек	3NY8	2,84	[29]
			6PS4	2,60	[30]
Q27460040		β_2 -AR, человек	3PDS	3,50	[44]
Q27461782		β_2 -AR, человек	3NY9	2,84	[29]

участие во взаимодействии со спиральными участками рецепторов. Таким образом, агонисты GPCR имеют два главных центра полярных взаимодействий с рецептором: с одной стороны, доноры/акцепторы Н-связей «головки», а с другой стороны, доноры/акцепторы и положительно заряженная аминогруппа «хвостика». Возникает вопрос, влияет ли расстояние между этими центрами на специфичность взаимодействия между лигандом и рецептором. Как

видно, длина той части «хвостика», которая расположена между N-атомом аминогруппы и ароматическим кольцом, одинакова во всех агонистах и равна трём ковалентным связям. Другими словами, между атомом N аминогруппы и бензольным кольцом агониста всегда находится два атома углерода. Более того, во всех агонистах с 6-членными ароматическими кольцами O-атомы гидроксильных групп в *para*- и *meta*-положениях «головок» и N-атомы ами-

ногрупп «хвостиков» разделены семью или шестью ковалентными связями соответственно.

Для сравнения в табл. 2 представлены частичные агонисты, антагонисты и обратные агонисты, обозначенные здесь как блокаторы β-адренорецепторов, в соответствии с терминологией, предложенной Emtage et al. [28]. Как видно, они также обладают ароматической «головкой» и «хвостиком с положительно заряженной аминок группой». Однако, в отличие от агонистов, эти лиганды-блокаторы имеют либо более длинные (табл. 2), либо более короткие (например, доксипин или бретилиумтозилат, которые в табл. 2 не представлены) участки «хвостиков» между N-атомом аминок группы и ароматическим кольцом. В блокаторах β-адренорецепторов между N-атомом аминок группы и ароматическим кольцом находятся, как правило, пять ковалентных связей, т.е. 4 атома (во многих случаях один из них – кислород) в отличие от агонистов, у которых в этой части «хвостика» три ковалентных связи, т.е. всего 2 атома углерода. Более того, многие антагонисты и обратные агонисты в ароматических «головках» не имеют доноров или акцепторов N-связей, или они располагаются в положениях, которые не позволяют им взаимодействовать со спиралью TM5. Отметим, что NH-группы цианопиндолола и каразолола расположены в *meta*-положениях относительно «хвостиков». Ещё одна особенность β-блокаторов состоит в том, что они, как правило, имеют «головки»

значительно большего размера, состоящие из двух или даже трёх колец в отличие от молекул агонистов.

Два центра полярных взаимодействий между β-адренорецепторами и их лигандами. Связывающий карман лигандов β-адренорецепторов располагается внутри ТМ-участка рецептора

Внеклеточная часть

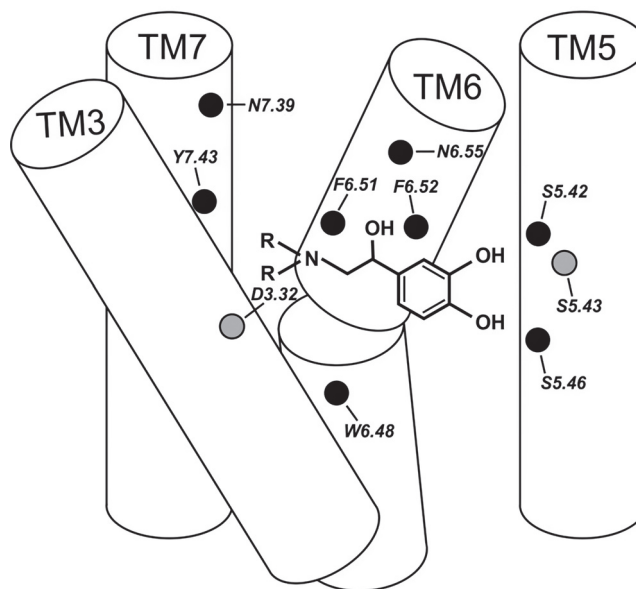


Рис. 1. Схематическое изображение типовой структуры агониста и α-спиралей, образующих сайт связывания с ним в β-адренорецепторах. Кружками показаны ключевые аминокислотные остатки, взаимодействующие с лигандом

	TM3	TM5	TM6	TM7
	D3.32 T3.37	S5.42 S5.43 S5.46	W6.48 F6.50 F6.51 F6.52	N7.39 Y7.43 N7.49
SP P06598 ADRB1_HUMAN	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P47899 ADRB1_MACMU	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9T196 ADRB1_BOVIN	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	GYAITSSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28998 ADRB1_PIG	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28927 ADRB1_SHEEP	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	GYAITSSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P79148 ADRB1_CANLF	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9T576 ADRB1_FELCA	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P07700 ADRB1_MELGA	CWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSISFYPLLLIMFVYLRVY	HKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLVNIVNF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P18090 ADRB1_RAT	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P34971 ADRB1_MOUSE	LWTSVDVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAIASSVVSFYPLCIMAFVYLRVF	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLANVVKAF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q42574 ADRB1_XENLA	FWTSVDVLCVTSASIEITLCVIST	AYAIASSISFYPLLLIMFVYLRVY	QKALKTLGIMGVFTLCWLPFFLVNIVNF	PDRLVFFVNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P07550 ADRB2_HUMAN	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28509 ADRB2_MACMU	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28044 ADRB2_BOVIN	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28997 ADRB2_PIG	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QPYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHGI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P54833 ADRB2_CANLF	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9T575 ADRB2_FELCA	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q84424 ADRB2_CAVPO	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIA	AYAIASSIVSFYPLVIMVVFVY	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVY	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P04274 ADRB2_MESAU	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P10608 ADRB2_RAT	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P18762 ADRB2_MOUSE	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q70431 ADRB2_MERUN	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHAI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q4KWL2 ADRB2_TSCYR	EFWTSIDVLCVTSASIEITLCVIAV	QAYAIASSIVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVHVI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q8UW08 ADRB2_ONCMY	EFWTAADVLCVTSASIEITLCVIAL	AYAVASSVVSFYPLVIMVVFVYS	LGIMGTFTLCWLPFFLVNIVVTI	EVYILLNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P13945 ADRB3_HUMAN	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YVLLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVL	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q28524 ADRB3_MACMU	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YVLLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVL	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P46626 ADRB3_BOVIN	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVV	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9S252 ADRB3_PIG	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVV	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9XT58 ADRB3_SHEEP	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVV	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9XT57 ADRB3_CAPHI	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGTFTLCWLPFFLVANVV	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q02262 ADRB3_CANLF	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIVGTFTLCWLPFFLVANVM	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q9T574 ADRB3_FELCA	ELWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	IFVALSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	LGIMLSTFSLCWLPPFFVANVRAL	AFALALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP Q60493 ADRB3_CAVPO	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIVGTFTLCWLPFFLVANVL	VFLALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P26255 ADRB3_RAT	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGFSLCWLPPFFLVANVL	VFLALNWLGANSFNPFLIYCRS
SP P25962 ADRB3_MOUSE	LWTSVDVLCVTSASIEITLCALAV	YALLSSVVSFYPLLLVLMVIFYA	TLGLIMGFSLCWLPPFFLVANVL	VFLALNWLGANSFNPFLIYCRS

Рис. 2. Множественное выравнивание последовательностей ТМ-спиралей 3, 5, 6 и 7 β-адренорецепторов различных видов животных. Последовательности собраны из базы Swiss-ProtUniProt (35 белков) [14]. Ключевые аминокислотные остатки в последовательностях выделены серым фоном

и главным образом состоит из внеклеточных частей ТМ-спиралей 3, 5, 6 и 7 (рис. 1). Многочисленные биохимические и генетические исследования, а также анализ кристаллических структур аминокислотных рецепторов позволил установить ключевые аминокислотные остатки в этих спиралях [45], взаимодействующие с лигандами. Мы предлагаем сгруппировать их в два центра полярных взаимодействий. Во всех β -адренорецепторах заряженные амины лигандов взаимодействуют с консервативным остатком аспарагиновой кислоты D3.32. Во взаимодействии с аминокислотными группами, а также с другими полярными группами «хвостиков» принимают участие консервативные остатки тирозина Y7.43 и остатки аспарагина N7.39. Таким образом, эти ключевые аминокислотные остатки образуют полярный центр связывания аминокислотных групп и других полярных групп «хвостиков» лигандов.

В другом центре полярных взаимодействий все β -адренорецепторы имеют остатки серина S5.42 и S5.46, и большинство из них имеют серин в положении 5.43. Таким образом, комплементарно расположенные доноры или акцепторы ароматической «головки» лиганда могут образовывать Н-связи с указанными аминокислотными остатками серинов. Недавние исследования [10] указывают, что треонин T3.37 также может взаимодействовать с полярными группами «головки» лигандов.

На рисунке 2 приведено выравнивание аминокислотных последовательностей ТМ-спиралей 3, 5, 6 и 7 подтипов β_1 -, β_2 - и β_3 -адренорецепторов различных видов животных. Оно показывает, что все ключевые аминокислотные остатки, упомянутые выше, являются высоко консервативными во всех подтипах β -адренорецепторов, последовательности которых установлены к настоящему времени.

Сравнение конформации агонистов, антагонистов и обратных агонистов, связанных с β -адренорецепторами. Рис. 3 демонстрирует в качестве примера кристаллические структуры агониста изопреналина (рис. 3, а) и антагониста цианопиндолола (рис. 3, б) в комплексе с адренергическим β_1 -рецептором в главном связывающем кармане [18, 33]. На рисунке хорошо видны боковые цепи остатков, образующих два центра полярных взаимодействий, а также конформации лигандов. На рис. 3, б чётко видно, что группа атомов О-С-С-С «хвостика» цианопиндолола находится в *gash*-конформации, т.е. наблюдается излом «хвостика», в то время как группа атомов С-С-С-Н «хвостика» изопреналина имеет *транс*-конформацию (рис. 3, а).

Рисунок 4 показывает, как эти структуры выглядят при наложении друг на друга. Здесь также хорошо видно, что группа атомов О-С-С-С образует излом «хвостика» цианопиндолола, а «хвостик» изопреналина имеет вытянутую конформацию. Как показывает анализ, такая

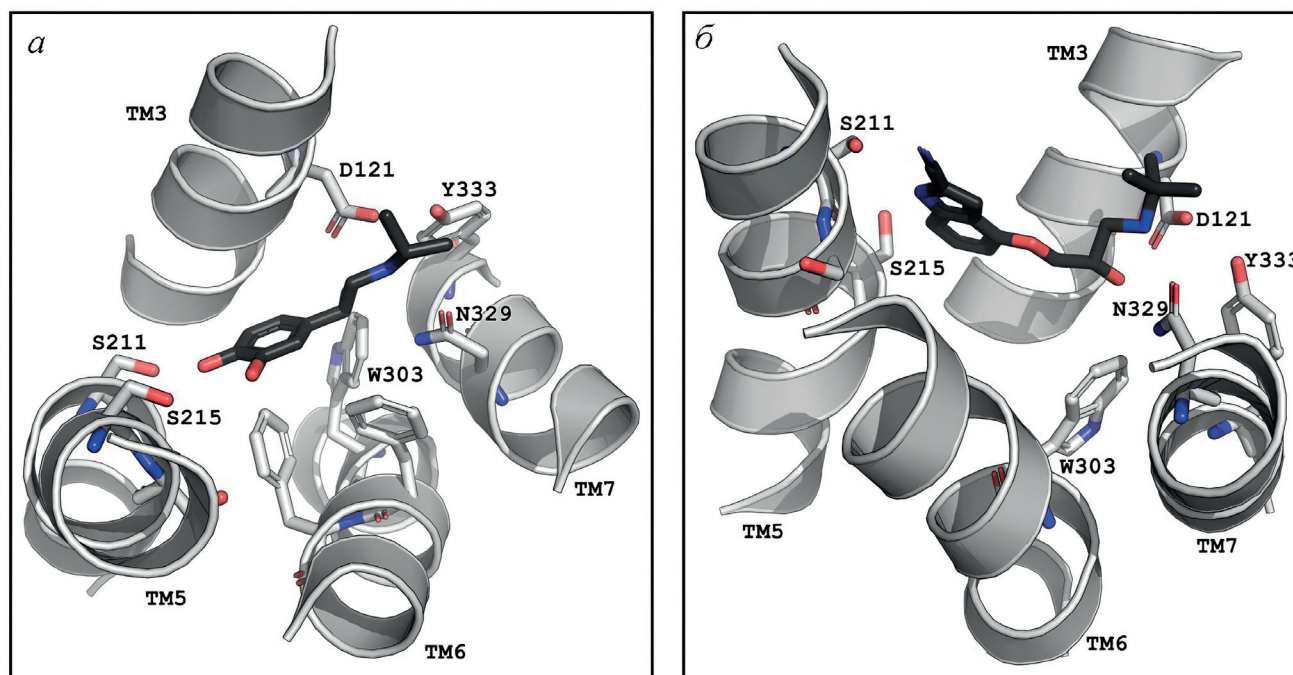


Рис. 3. Главный связывающий карман аминокислотного β_1 -адренорецептора в комплексе с агонистом (изопреналин PDB ID, 2Y03) (а) и антагонистом (цианопиндолол PDB ID, 2YCY) (б). Изображение получено с использованием Программы молекулярной графики PyMOL

же картина наблюдается и в других комплексах агонистов и антагонистов с рецепторами (табл. 1 и 2). Аминогруппы обоих лигандов располагаются в центре связывания аминов (D3.32, N7.39 и Y7.43), тогда как гидроксильные группы «головки» катехола изопреналина так же, как аминогруппа и цианогруппа «головки» цианопиндолола, располагаются в другом центре полярных взаимодействий (S5.42, S5.43, S5.46). Однако общая геометрия агониста и антагониста сильно различается. В изопреналине «хвостик» имеет вытянутую *транс*-конформацию, и в целом молекула выглядит как «натянутая струна», которая стабилизирует активированное состояние рецептора. «Хвостик» цианопиндолола имеет излом между N-атомом аминогруппы и ароматическим кольцом, в результате чего создаётся зигзагообразная конформация (рис. 3 и 4). В других условиях (например, в нативной мембране, а не в кристаллической структуре) «хвостик» антагониста может перейти в вытянутую конформацию и обратно, т.е. в комплексах рецепторов с антагонистами TM-спирали могут иметь большую динамическую подвижность, чем в комплексах с агонистами [6].

Мы исследовали другие агонисты, связанные с соответствующими β -адренорецепторами, и обнаружили, что части «хвостиков» между N-атомами аминогрупп и ароматическими кольцами имеют вытянутые конформации во всех случаях (см., например, PDB ID: 2Y00, 2Y02, 2Y04, 3P0G, 3PDS, 3SN6, а также другие структуры, представленные в табл. 1). С другой стороны, показано, что антагонисты имеют изломы в частях «хвостиков» между N-атомами аминогрупп и ароматическими кольцами (см., например, PDB ID: 2VT4, 2YCW, 2RH1,

3D4S, 3NY8, 3NY9, 3NYA, 3PBL, 3RZE и другие структуры, представленные в табл. 2). Эти данные дают нам основания считать, что вытянутая конформация «хвостика» агонистов играет одну из ключевых ролей в активации β -адренорецепторов, а также может иметь значение и для других типов аминокергических рецепторов. Мы также предполагаем, что расстояние между двумя центрами полярных взаимодействий молекулы агониста должно быть равным (или близким) расстоянию между соответствующими центрами активированного рецептора.

Роль «натянутой струны» агониста в активации β -адренорецепторов. Стереохимический анализ пространственных структур, описанный выше, позволяет предположить, что молекула агониста может действовать как натянутая струна, которая стабилизирует взаимное расположение TM-спиралей 3, 5, 6 и 7, соответствующее активному состоянию рецептора (рис. 1). Выглядит так, как будто спираль TM5 с одной стороны и спирали TM3 и TM7 с другой стороны сблизилась в результате взаимодействия с агонистом. Важно отметить, эта «натянутая струна» взаимодействует с триптофаном W6.48, а также с ароматическими остатками фенилаланина F6.51 и F6.52. Эти взаимодействия, вероятно, являются ответственными за изменение пространственного расположения спирали TM6 в активном состоянии рецептора, т.е. за её вращение и/или вертикальное движение вокруг точки вращения, расположенной в середине мембраны, что приводит к открытию внутриклеточной части рецептора, которое необходимо для связывания G-белка [46–48]. Взаимодействие с триптофаном W6.48 вызывает небольшое вращение спирали TM6 во внеклеточной части рецептора, что

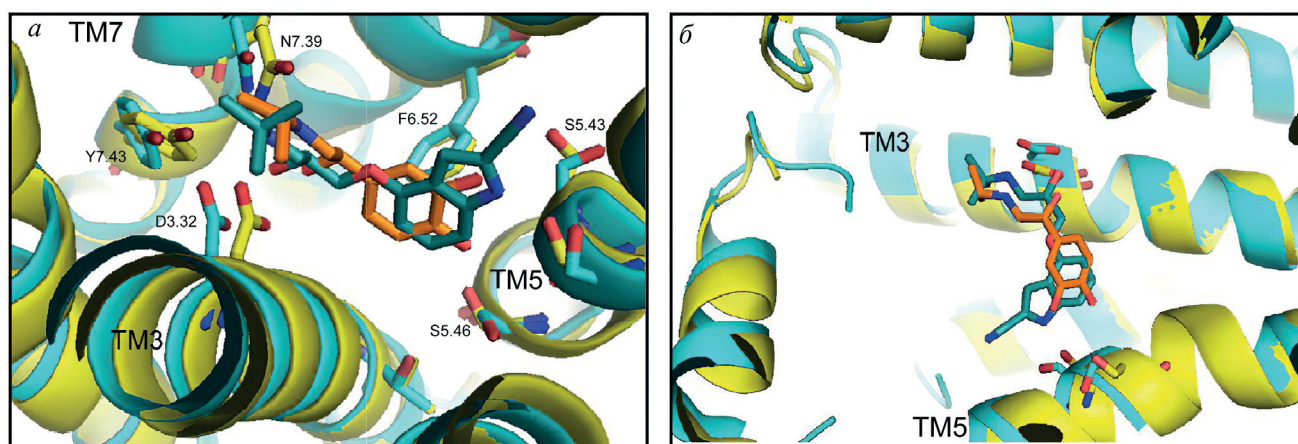


Рис. 4. Сравнение структуры агониста (изопреналин, оранжевый) в комплексе с β_1 -адренорецептором (PDB ID 2Y03, жёлтый) и структуры антагониста (цианопиндолол, сине-зелёный) в комплексе с β_1 -адренорецептором (PDB ID 2YCY, голубой). *а* – Вид с внеклеточной стороны рецептора; ключевые остатки аминокислот помечены в соответствии с нomenclатурой Ballesteros и Weinstein [17]. *б* – Сравнение конформации связанных лигандов при наложении пространственных структур комплексов. Изображение получено с использованием Программы молекулярной графики PyMOL

из-за характерного изгиба спирали, вызванного остатком пролина Р6.50, приводит к значительному увеличению амплитуды вращения в цитоплазматической части [11]. В отличие от агониста, антагонист или обратный агонист имеет более длинный фрагмент «хвостика», его гибкую конформацию и изгиб в середине «хвостика», а также слабые полярные взаимодействия «головки» со спиралью ТМ5. В связи с этим такие молекулы не могут действовать как «натянутая струна», несмотря на то что они занимают тот же самый активный центр рецептора, в результате их полярных и гидрофобных взаимодействий. Таким образом, взаимодействия этих молекул с рецепторами не могут существенно изменить взаимное расположение спирали ТМ6 относительно других спиралей и, следовательно, открыть сайт связывания с G-белком.

Основываясь на результатах нашего анализа, мы делаем несколько выводов о том, каким образом минимальные различия в структуре лигандов могут влиять на их функциональные характеристики.

1. Удлинение фрагмента «хвостика» агониста между N-атомом аминокислотной группы и его ароматическим кольцом скорее всего будет приводить к превращению агониста в антагониста.

2. Укорочение фрагмента «хвостика» антагониста или обратного агониста, имеющих полярные заместители в соответствующих позициях их ароматических «головок», до трёх ко-

валентных связей может привести к превращению их в агонистов или частичных агонистов.

3. Удаление гидроксильных групп катехола или соответствующих полярных заместителей в других ароматических «головках» может уменьшать активность агониста. Модификация этих полярных заместителей алифатическими или ароматическими группами, по всей вероятности, будет иметь тот же самый эффект.

4. Модификации молекул крупными заместителями в аминокислотных группах могут уменьшать или даже предотвращать связывание с рецепторами как агонистов, так и антагонистов.

5. *Транс*-конформация (вытянутая конформация) фрагмента «хвостика» агониста может быть превращена в *гош*- или *цис*-конформацию посредством химической модификации, что может привести к уменьшению активности агониста или даже превращению его в антагониста.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-04-00453).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой и иных сферах.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective, *Science*, **287**, 1960-1964, doi: 10.1126/science.287.5460.1960.
2. Eiger, D. S., Pham, U., Gardner, J., Hicks, C., and Rajagopal, S. (2022) GPCR systems pharmacology: a different perspective on the development of biased therapeutics, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **322**, 887-895, doi: 10.1152/ajpcell.00449.2021.
3. Costanzi, S., Siegel, J., Tikhonova, I. G., and Jacobson, K. A. (2009) Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors, *Curr. Pharm. Des.*, **15**, 3994-4002, doi: 10.2174/138161209789824795.
4. Kahsai, A. W., Xiao, K., Rajagopal, S., Ahn, S., Shukla, A. K., et al. (2011) Multiple ligand-specific conformations of the β_2 -adrenergic receptor, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 692-700, doi: 10.1038/nchembio.634.
5. Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2012) Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures, *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**, 17-27, doi: 10.1016/j.tips.2011.09.003.
6. Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R. O., Mildorf, T. J., Arlow, D. H., et al. (2013) The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation, *Cell*, **152**, 532-542, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.008.
7. Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2018) The molecular basis of G protein-coupled receptor activation, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 897-919, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910.
8. Frei, J. N., Broadhurst, R. W., Bostock, M. J., Solt, A., Jones, A. J. Y., et al. (2020) Conformational plasticity of ligand-bound and ternary GPCR complexes studied by ^{19}F NMR of the β_1 -adrenergic receptor, *Nat. Commun.*, **11**, 669, doi: 10.1038/s41467-020-14526-3.
9. Lebon, G., Warne, T., and Tate, C. G. (2012) Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 482-490, doi: 10.1016/j.sbi.2012.03.007.
10. Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., et al. (2013) Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors, *Science*, **340**, 610-614, doi: 10.1126/science.1232807.
11. Standfuss, J., Edwards, P. C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., et al. (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin, *Nature*, **471**, 656-660, doi: 10.1038/nature09795.

12. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., et al. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature*, **494**, 185-194, doi: 10.1038/nature11896.
13. Granier, S., and Kobilka, B. (2012) A new era of GPCR structural and chemical biology, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 670-673, doi: 10.1038/nchembio.1025.
14. The UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D480-D489, doi: 10.1093/nar/gkaa1100.
15. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., et al. (2000) The protein data bank, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
16. Sayle, R. A., and Milner-White, E. J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 374, doi: 10.1016/s0968-0004(00)89080-5.
17. Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, in *Methods in Neurosciences* (Sealfon S. C., ed.) Academic Press, USA, pp. 366-428.
18. Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J. G., Nehmé, R., Edwards, P. C., et al. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor, *Nature*, **469**, 241-244, doi: 10.1038/nature09746.
19. Warne, T., Edwards, P. C., Doré, A. S., Leslie, A. G. W., and Tate, C. G. (2019) Molecular basis for high-affinity agonist binding in GPCRs, *Science*, **364**, 775-778, doi: 10.1126/science.aau5595.
20. Ring, A. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Enos, M. D., Weis, W. I., et al. (2013) Adrenaline-activated structure of $\beta(2)$ -adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody, *Nature*, **502**, 575-579, doi: 10.1038/nature12572.
21. Xu, X., Kaindl, J., Clark, M. J., Hübner, H., Hirata, K., et al. (2021) Binding pathway determines norepinephrine selectivity for the human $\beta(1)$ AR over $\beta(2)$ AR, *Cell Res.*, **31**, 569-579, doi: 10.1038/s41422-020-00424-2.
22. Lee, Y., Warne, T., Nehmé, R., Pandey, S., Dwivedi-Agnihotri, H., et al. (2020) Molecular basis of β -arrestin coupling to formoterol-bound $\beta(1)$ -adrenoceptor, *Nature*, **583**, 862-866, doi: 10.1038/s41586-020-2419-1.
23. Zhang, Y., Yang, F., Ling, S., Lv, P., Zhou, Y., et al. (2020) Single-particle cryo-EM structural studies of the $\beta(2)$ AR-Gs complex bound with a full agonist formoterol, *Cell Discov.*, **6**, 4, doi: 10.1038/s41421-020-0176-9.
24. Yang, F., Ling, S. L., Zhou, Y. X., Zhang, Y. N., Lv, P., et al. (2021) Different conformational responses of the beta2-adrenergic receptor-Gs complex upon binding of the partial agonist salbutamol or the full agonist isoprenaline, *Natl. Sci. Rev.*, **8**, nwaa284, doi: 10.1093/nsr/nwaa284.
25. Masureel, M., Zou Y., Picard, L. P., Van der Westhuizen, E., Mahoney, J. P., et al. (2018) Structural insights into binding specificity, efficacy and bias of a $\beta(2)$ AR partial agonist, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 1059-1066, doi: 10.1038/s41589-018-0145-x.
26. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., et al. (2011) Crystal structure of the $\beta(2)$ adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*, **477**, 549-555, doi: 10.1038/nature10361.
27. Liu, X., Masoudi, A., Kahsai, A. W., Huang, L. Y., Pani, B., et al. (2019) Mechanism of $\beta(2)$ AR regulation by an intracellular positive allosteric modulator, *Science*, **364**, 1283-1287, doi: 10.1126/science.aaw8981.
28. Emtage, A. L., Mistry, S. N., Fischer, P. M., Kellam, B., and Laughton, C. A. (2017) GPCRs through the keyhole: the role of protein flexibility in ligand binding to β -adrenoceptors, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **35**, 2604-2619, doi: 10.1080/07391102.2016.1226197.
29. Wacker, D., Fenalti, G., Brown, M. A., Katritch, V., Abagyan, R., et al. (2010) Conserved binding mode of human beta2 adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 11443-11445, doi: 10.1021/ja105108q.
30. Ishchenko, A., Stauch, B., Han, G. W., Batyuk, A., Shiriaeva, A., et al. (2019) Toward G protein-coupled receptor structure-based drug design using X-ray lasers, *IUCrJ*, **24** (Pt 6), 1106-1119, doi: 10.1107/S2052252519013137.
31. Liu, X., Kaindl, J., Korczynska, M., Stöbel, A., Dengler, D., Stanek, M., et al. (2020) An allosteric modulator binds to a conformational hub in the $\beta(2)$ adrenergic receptor, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 749-755, doi: 10.1038/s41589-020-0549-2.
32. Warne, T., Edwards, P. C., Leslie, A. G., and Tate, C. G. (2012) Crystal structures of a stabilized $\beta(1)$ -adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol, *Structure*, **20**, 841-849, doi: 10.1016/j.str.2012.03.014.
33. Moukhametzianov, R., Warne, T., Edwards, P. C., Serrano-Vega, M. J., Leslie, A. G., et al. (2011) Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a beta1-adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8228-8232, doi: 10.1073/pnas.1100185108.
34. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., et al. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*, **450**, 383-387, doi: 10.1038/nature06325.
35. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., et al. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science*, **23**, 1258-1265, doi: 10.1126/science.1150577.
36. Zou, Y., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2012) N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein coupled receptor, *PLoS One*, **7**, e46039, doi: 10.1371/journal.pone.0046039.
37. Huang, C. Y., Olieric, V., Ma, P., Howe, N., Vogeley, L., et al. (2016) In meso *in situ* serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins at cryogenic temperatures, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **72** (Pt 1), 93-112, doi: 10.1107/S2059798315021683.

38. Staus, D. P., Strachan, R. T., Manglik, A., Pani, B., Kahsai, A. W., et al. (2016) Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation, *Nature*, **535**, 448-452, doi: 10.1038/nature18636.
39. Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., et al. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*, **454**, 486-491, doi: 10.1038/nature07101.
40. Miller-Gallacher, J. L., Nehmé, R., Warne, T., Edwards, P. C., Schertler, G. F., et al. (2014) The 2.1 Å resolution structure of cyanopindolol-bound β 1-adrenoceptor identifies an intramembrane Na⁺ ion that stabilises the ligand-free receptor, *PLoS One*, **9**, e92727, doi: 10.1371/journal.pone.0092727.
41. Leslie, A. G., Warne, T., and Tate, C. G. (2015) Ligand occupancy in crystal structure of β 1-adrenergic G protein-coupled receptor, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 941-942, doi: 10.1038/nsmb.3130.
42. Sato, T., Baker, J., Warne, T., Brown, G. A., Leslie, A. G., et al. (2015) Pharmacological analysis and structure determination of 7-methylcyanopindolol-bound β 1-adrenergic receptor, *Mol. Pharmacol.*, **88**, 1024-1034, doi: 10.1124/mol.115.101030.
43. Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., et al. (2008) A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor, *Structure*, **16**, 897-905, doi: 10.1016/j.str.2008.05.001.
44. Rosenbaum, D. M., Zhang, C., Lyons, J. A., Holl, R., Aragao, D., et al. (2011) Structure and function of an irreversible agonist- β (2) adrenoceptor complex, *Nature*, **469**, 236-240, doi: 10.1038/nature09665.
45. Conner, A. C., Barwell, J., Poyner, D. R., and Wheatley, M. (2011) The use of site-directed mutagenesis to study GPCRs, *Methods Mol. Biol.*, **746**, 85-98, doi: 10.1007/978-1-61779-126-0_5.
46. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., et al. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β (2) adrenoceptor, *Nature*, **469**, 175-180, doi: 10.1038/nature09648.
47. Chung, K. Y. (2013) Structural aspects of GPCR-G protein coupling, *Toxicol. Res.*, **29**, 149-155, doi: 10.5487/TR.2013.29.3.149.
48. Wu, Y., Zeng, L., and Zhao, S. (2021) Ligands of adrenergic receptors: a structural point of view, *Biomolecules*, **11**, 936, doi: 10.3390/biom11070936.

AGONISTS IN THE EXTENDED CONFORMATION STABILIZE THE ACTIVE STATE OF β -ADRENOCEPTORS

A.V. Efimov^{1*}, O.V. Meshcheryakova², and A.G. Ryazanov³

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia, efimov@prores.ru

² Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 185910 Petrozavodsk, Russia

³ Department of Pharmacology, Rutgers Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, 08854 New Jersey, USA

In the present study, a comparative analysis of the structures of agonists and antagonists, their interactions with transmembrane (TM) β -adrenoceptors were performed, and the mechanism of activation of these receptors was proposed. A characteristic feature of the agonist and antagonist molecule is that it has a hydrophobic “head” (most often one or two aromatic rings) and a “tail” with a positively charged amino group. In all β -adrenergic agonists, there are two carbon atoms between the aromatic ring of the “head” and the nitrogen atom of the amino group. In antagonist molecules, this length is increased to four atoms due to additional carbon and oxygen atoms or reduced. The “head” of the agonist, as a rule, has two H-bond donors or acceptors in the *para*- and *meta*-positions of the aromatic rings. There are no such donors/acceptors in the “head” of the antagonist or they are in inapplicable positions. Analysis of the known three-dimensional structures of complexes of agonists and β -adrenergic receptors shows that the “head” of the agonist forms two H-bonds with the TM5 helix, and the “tail” forms an ionic bond with the D3.32 residue of the TM3 helix and one or two H-bonds with the TM7 helix. The “tail” of the antagonist can form similar bonds, but its “head” and the TM5 helix interact much weaker. As a result of these interactions, the agonist molecule acquires an extended conformation in the form of a “stretched string”, in contrast to the antagonist molecule, which has a longer, bended and flexible “tail”. The “stretched string” of the agonist interacts with the TM6 helix (primarily with the W6.48 residue) and turns it, which leads to the opening of the G-protein binding site on the intracellular side of the receptor. The flexible and larger antagonist molecule has no such effect.

Keywords: β -adrenoceptor, GPCR, agonist, antagonist, activation mechanism

УДК 576.315.42

ДОМЕННАЯ МОДЕЛЬ ОРГАНИЗАЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА: ОТ ЗАКРЕПЛЕННЫХ НА ЯДЕРНОМ МАТРИКСЕ ПЕТЕЛЬ ДНК К ТАДАМ

Обзор

© 2022 С.В. Разин^{1,2*}, И.В. Жегалова^{3,4,5}, О.Л. Кангидзе¹

¹ Институт биологии гена Российской академии наук,
119334 Москва, Россия; электронная почта: sergey.v.razin@inbox.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

⁵ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.05.2022

После доработки 18.06.2022

Принята к публикации 22.06.2022

В обзоре анализируется развитие представлений о доменной организации эукариотического генома. Подробно рассматриваются результаты работ по изучению прикрепленных к ядерному матриксу петель ДНК и показывается место этих результатов в современной модели пространственной организации эукариотического генома. Приводится критический анализ результатов, демонстрирующих, что топологически-ассоциированные домены хроматина являются структурно-функциональными блоками генома, и обосновывается заключение о том, что эти блоки принципиально отличаются от тех доменов, существование которых предполагалось сформулированной в 80-е годы прошлого века доменной гипотезой организации эукариотического генома. На основании всего обсуждения делается заключение о том, что модель, постулирующая, что эукариотический геном построен из единообразно организованных функциональных блоков, оказалась несостоятельной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроматин, структурно-функциональные домены генома, топологически-ассоциированные домены хроматина, петли ДНК, ДНК-топоизомераза II.

DOI: 10.31857/S0320972522070090, EDN: AWAING

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ДНКазе ДОМЕНЫ ГЕНОМА И ЗАКРЕПЛЕННЫЕ НА ЯДЕРНОМ МАТРИКСЕ ПЕТЛИ ДНК

Открытие нуклеосом в середине 70-х годов XX века [1, 2] ознаменовало начало новой эры в изучении хроматина. Одновременно с характеристикой собственно нуклеосом исследовате-

ли заинтересовались способом макроукладки нуклеосомной фибриллы. Прежде всего предметом изучения стала так называемая 30-нм хроматиновая фибрилла, которую представляли как соленоид [3], либо зигзагообразную структуру [4]. Вопрос о том, каким образом 30-нм хроматиновая фибрилла укладывается далее в интерфазных и метафазных хромосомах оставался открытым. Примерно в то же время Петер Кук и соавторы продемонстрировали, что после разрушения нуклеосом посредством экстракции ядер концентрированными солевыми растворами ДНК остается организованной в большие суперспирализованные петли, закрепленные на нерастворимой белко-

Принятые сокращения: ДНКазы – дезоксирибонуклеаза I, ТАДы – топологически-ассоциированные домены хроматина, т.п.н. – тысяча пар оснований, S/MARs – последовательности ДНК, предпочтительно связывающиеся с ядерным матриксом.

* Адресат для корреспонденции.

вой структуре [5, 6], которая получила название ядерный матрикс [7], или ядерный скелет [8]. Эти наблюдения были в последующем подтверждены в работах других лабораторий [9–11]. Особо стоит отметить визуализацию под электронным микроскопом закрепленных на остове метафазной хромосомы, либо ядерном матриксе петель ДНК [12, 13]. Оценка размера петель ДНК, проводившаяся с использованием разных методических подходов [14], привела к неоднозначным результатам: от 50 т.п.н. [12] до 1000–1500 т.п.н. [5, 15]. В рамках сформулированной несколько позднее радиально-петлевой модели иерархической упаковки ДНК в интерфазных и метафазных хромосомах [16–18], петли ДНК считали третьим уровнем упаковки после нуклеосомной нити и 30-нм нуклеосомной фибриллы. Иными словами, считалось, что 30-нм хроматиновая фибрилла организована в петли, закрепленные на скелетных структурах хромосомы.

Другие исследования, проводившиеся примерно в то же время, продемонстрировали, что активные гены предпочтительно расщепляются ДНКазой в пермеабилезованных клетках [19]. Последующие работы показали, что отличающиеся предпочтительной чувствительностью к ДНКазе сегменты генома являются достаточно протяженными и могут, наряду с активными генами, включать неработающие псевдогены [20–22]. На основании этих наблюдений была сформулирована доменная гипотеза организации эукариотического генома, основной постулат которой состоял в том, что геном построен из структурно-функциональных блоков, транскрипционный статус которых контролируется способом упаковки хроматиновой фибриллы в рамках блока в целом (рис. 1, *a*) [23, 24]. Регуляция транскрипции представлялась двухэтапным процессом: (1) активация хроматинового домена и (2) активация промоторов индивидуальных генов внутри домена [25]. Модель предполагала наличие регуляторных элементов, контролирующих транскрипционный статус домена в целом, и определенных структурных единиц в хромосомах, в границах которых могут происходить изменения способа укладки хроматина. Обнаружение области контроля локуса домена бета-глобиновых генов [26, 27] способствовало широкому признанию данной модели.

Что касается структурных единиц в хромосомах, то внимание ученых привлекли упоминавшиеся выше петли ДНК. Учитывая приблизительное сходство размеров этих петель и сегментов генома, демонстрирующих дифференциальную чувствительность к обработке

ДНКазой в клетках, дифференцированных по разным путям, было заманчиво предположить, что именно хроматиновые петли и являются структурно-функциональными блоками генома. Соответственно, участки закрепления оснований хроматиновых петель на скелетных структурах хромосомы должны были ограничивать геномный сегмент, в рамках которого могут происходить зависящие от типа клеток изменения способа упаковки хроматина [28]. Это стимулировало исследования участков прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу/скелету.

Общая стратегия картирования оснований петель ДНК и позиций генов в петлях ДНК была предложена в лаборатории П. Кука [29]. Она состояла в анализе распределения индивидуальных последовательностей ДНК между отщепленной и оставшейся связанной со скелетными элементами хромосомы фракциями ДНК по ходу обработки экстрагированных концентрированным солевым раствором ядер возрастающими количествами нуклеаз (рис. 1, *б*). В предельном случае связанными со скелетными элементами хромосомы должны были остаться только основания петель ДНК. Результаты, полученные с использованием этого протокола, оказались достаточно неожиданными. Было продемонстрировано, что со скелетными элементами хромосомы предпочтительно связаны транскрибирующиеся и реплицирующиеся последовательности ДНК [7, 30–32]. Эти результаты были интерпретированы в терминах модели, постулирующей, что транскрипция и репликация осуществляются иммобилизованными РНК- и ДНК-полимеразами, организованными в транскрипционные и репликативные фабрики [33–35]. Последующие работы продемонстрировали существование в ядрах так называемых фокусов репликации и транскрипции, которые отождествили с упомянутыми выше репликативными и транскрипционными фабриками [36, 37]. Идея о том, что пространственная организация генома направляется привлечением различных его сегментов к транскрипционным фабрикам, не потеряла своей актуальности и в настоящее время [38, 39].

Демонстрация того, что прикрепление ДНК к скелетным элементам хромосомы прямо связано с осуществлением синтетических процессов, противоречила предположению о том, что хроматиновые петли являются структурно-функциональными блоками генома. В этой связи модель организации хроматиновых петель была модифицирована. Постулировалось, что наряду с динамичными функциональными прикреплениями ДНК к скелетным элементам

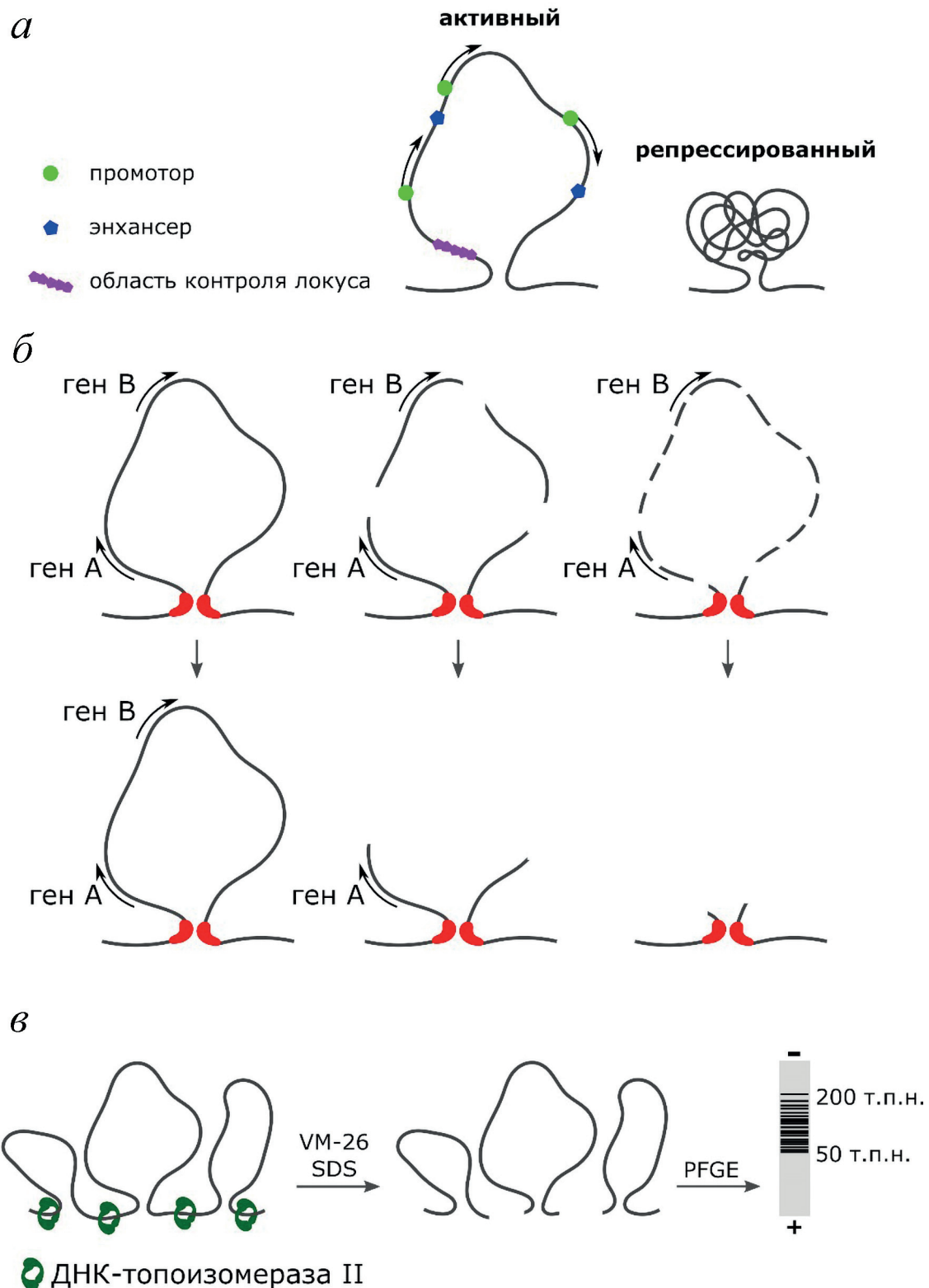


Рис. 1. Прикрепленные к ядерному матриксу петли ДНК. *a* – Схематическое представление доменной гипотезы организации генома. Группа генов, контролируемых энхансерами и областью контроля локуса (в современной терминологии – суперэнхансером), заключена в петлю ДНК. Изменение способа укладки хроматина в рамках всей петли контролирует транскрипционный статус домена. *б* – Стратегия картирования позиций генов относительно участков прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу. По мере внесения разрывов в ДНК происходит переход в растворимую фракцию сначала дистальных частей петли ДНК, а потом и остальных ее частей, за исключением собственно участков прикрепления к ядерному матриксу. *в* – Разрезание генома на петлевые домены посредством внесения разрывов ДНК-топоизомеразой II, локализованной в основаниях хроматиновых петель. Последующий анализ проводится с использованием гель-электрофореза в пульсирующем поле. VM-26 – тенипозид; SDS – додецилсульфат натрия; PFGE – гель-электрофорез в пульсирующем поле

хромосомы существуют и постоянные структурные участки прикрепления, которые ограничивают структурно-функциональные блоки генома [40]. Некоторыми исследователями было высказано предположение о том, что ассоциация транскрибирующихся последовательностей ДНК со скелетными элементами хромосомы является артефактом, возникающим в результате агрегации транскрипционных комплексов и новосинтезированной РНК в ходе солевой экстракции [41]. Для того чтобы избежать такой агрегации, было предложено использовать для экстракции гистонов слабый ионный детергент, диодосалицилат лития [41]. Другие авторы предположили, что последовательности ДНК, участвующие в закреплении петель на ядерном матриксе, должны предпочтительно связываться с этой структурой *in vitro*. Оба подхода позволили идентифицировать одни и те же геномные элементы, которые получили названия SARs (Scaffold Attachment Regions) [41] и MARs (Matrix Attachment regions) [42]. Позже был предложен термин S/MARs, комбинирующий оба этих названия [43]. Хотя первоначальные результаты указывали на то, что S/MARs действительно могут организовывать в петли функциональные блоки генома [41, 42, 44–47], позже стало очевидно, что количество S/MARs в геноме избыточно по отношению к ожидаемому количеству структурно-функциональных блоков генома и что эти элементы могут располагаться как в некодирующих областях генома, так и внутри генов [48]. S/MAR-элементы не имеют выраженного сходства на уровне последовательности ДНК, но обладают рядом общих характеристик, таких как высокое содержание АТ-пар [42, 49, 50], присутствие сайтов узнавания ДНК-топоизомеразой II [51, 52] и способность плавиться в относительно мягких условиях, в том числе при повышенном уровне суперспирализации ДНК [53]. Из общих соображений можно было ожидать, что пограничные элементы структурно-функциональных доменов генома должны обладать барьерной активностью, т.е. должны препятствовать распространению гетерохроматина. Многочисленные попытки продемонстрировать такую активность S/MARs привели к неоднозначным результатам [54–56]. Кроме того, было показано, что S/MAR-элементы не обладают энхансер-блокирующей активностью [57]. В настоящее время наиболее обоснованной представляется модель, согласно которой S/MAR-элементы способствуют созданию и поддержанию открытых доменов хроматина. Продемонстрированная в ряде экспериментов способность S/MAR-элементов обеспечивать

высокий уровень экспрессии трансгенов скорее всего связана именно с поддержанием активного статуса хроматиновых доменов [58–60].

Способность S/MARs связываться *in vitro* со скелетными структурами ядра [42, 61] стимулировала поиск белков, связывающихся с S/MAR-элементами. Таких белков было обнаружено достаточно много [62]. Последующие исследования показали, что ряд из них (SATB1, SAF-A/hnRNP, SAF-B и другие) играют важную роль в контроле динамики хроматина и поддержании архитектуры клеточного ядра [62–65].

РАЗРЕЗАНИЕ ГЕНОМА ПО ГРАНИЦАМ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ

Неоднозначные результаты о роли S/MAR-элементов в разграничении петлевых доменов ДНК стимулировали разработку других подходов для картирования границ петель ДНК. Как обычно в экспериментальной науке, разработка новых методов, в данном случае метода разделения чрезвычайно длинных фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле [66], открыла новые возможности для решения старых вопросов. Вместо того чтобы пытаться изолировать фрагменты ДНК, лежащие в местах крепления петель ДНК к белковым структурам клеточного ядра, было предложено разрезать геном на петли, внося разрывы в основания петель с помощью ДНК-топоизомеразы II (рис. 1, в) [67, 68]. По ходу своей нормальной работы ДНК-топоизомераза II вносит двунитевые разрывы в ДНК, которые потом зашивает после пропускания одной двуспиральной молекулы ДНК через другую. Существует целый ряд агентов, которые блокируют работу ДНК-топоизомеразы II на стадии промежуточного комплекса с разорванной ДНК. Обработка клеток этими агентами может быть использована для внесения разрывов в ДНК в местах посадки фермента [69, 70]. Предложенная стратегия была основана на том факте, что ДНК-топоизомераза II является компонентом как ядерного матрикса, так и остова метафазной хромосомы [71, 72], в силу чего должна контактировать с основаниями петель ДНК, прикрепленными к этим структурам. Обработка концентрированными солевыми растворами не инактивирует ДНК-топоизомеразу II; поэтому расщепление ДНК этим ферментом можно проводить как в живых клетках, так и в ядрах, экстрагированных концентрированным солевым раствором.

Вырезанные петли ДНК разделяли посредством электрофореза в пульсирующем поле. Позиции концов петель можно было картировать относительно сайтов расщепления ДНК редкощеплящими рестриктазами (Not I, Sfi I) с использованием метода непрямого мечения концов ДНК [73]. Применение этого протокола позволило картировать основания петель в нескольких сегментах различных геномов [67, 68, 74–76]. Домен куриных альфа-глобиновых генов оказался заключенным в одну петлю [68]. В рибосомных генах каждый повторяющийся блок локализован в отдельной петле [67]. В то же время ген дистрофина оказался организован в несколько петель [76]. Дальнейшие исследования показали, что крупномасштабная фрагментация ДНК (предположительно, вырезание петель ДНК) происходит на начальных стадиях апоптоза, запускаемого различными агентами [77–81]. Аналогичный паттерн крупномасштабного расщепления генома наблюдали и при ограниченной обработке пермеабилizированных клеток различными нуклеазами [82–84].

Концепция, постулирующая наличие в клеточном ядре жесткой поддерживающей структуры – ядерного матрикса – не получила удовлетворяющего экспериментального подтверждения [85–87]. Тем не менее крупномасштабная фрагментация генома, обнаруженная в ходе исследований ядерного матрикса, прямо указывает на существование протяженных структурных блоков в геноме. Следует сказать, что оценка размеров длинных фрагментов ДНК после их разделения посредством электрофореза в пульсирующем поле весьма приближительна, в том числе из-за присущих этому методу артефактов, проявляющихся в наличии участков компрессии. Рядом авторов было показано, что распределение вырезаемых фрагментов ДНК по длине является непрерывным и достаточно широким (от 50 т.п.н. до 1000 и более т.п.н.) [76]. Другие авторы сообщали о двух размерных классах сегментов генома, вырезаемых на начальных стадиях апоптоза: 100–1000 т.п.н. и 1000–2000 т.п.н. [80]. В рамках современных представлений об упаковке генома в клеточном ядре (см. ниже) такую фрагментацию можно объяснить внесением разрывов в основания петель ДНК различной природы (короткие фрагменты) и в границы топологически-ассоциированных доменов (длинные фрагменты). Исследования крупномасштабной фрагментации генома проводились до начала так называемой постгеномной эры. В связи с этим положения оснований петель были установлены только в ограниченном числе ге-

номных регионов. В ряде случаев эти положения совпадали с горячими точками хромосомных перестроек и ломкими сайтами (common fragile sites) в хромосомах [88–91]. Это позволило предположить, что петли ДНК могут быть эволюционными блоками генома [92, 93].

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ УПАКОВКЕ ДНК В ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМАХ

Результаты, полученные в последние десятилетия, поставили под сомнения иерархическую модель упаковки хроматина, сформулированную в 80-е годы прошлого столетия. Целый ряд наблюдений, сделанных с использованием различных методических подходов, показал, что 30-нм хроматиновая фибрилла, которую можно наблюдать в препаратах солюбилизованного хроматина, практически отсутствует в клеточном ядре. Было, в частности, показано, что как в гетерохроматине, так и в эухроматине уровень компактизации ДНК существенно превышает таковой в составе 30-нм фибриллы [94, 95]. Попытки обнаружить 30-нм фибриллы в ядрах и метафазных хромосомах с использованием различных вариантов электронной микроскопии оказались безуспешными [96–101]. Хотя полностью исключить возможность присутствия в клеточных ядрах коротких сегментов 30-нм фибриллы едва ли возможно, основным путем формирования компактных хроматиновых структур является упаковка 10-нм нуклеосомных нитей в нерегулярные компактные массы, стабилизированные взаимодействиями между нуклеосомами разных фибрилл [102–105]. Эти массы могут быть более или менее компактными в зависимости от профилей модификаций гистонов. В частности, ацетилирование гистонов способствует менее компактной укладке хроматиновых масс, препятствуя установлению межнуклеосомных контактов [106]. В компактизации локальных сегментов хроматина определенную роль играет формирование жидкофазных конденсатов [107–110]. При этом хроматин в целом демонстрирует характеристики, присущие скорее гидрогелю или даже твердому телу, чем жидкофазному конденсату [102, 111, 112].

На первый взгляд, упаковка хроматина в виде низкоупорядоченных компактных масс оставляет мало возможностей для существования структурных блоков хроматина на уровне макроукладки нуклеосомной фибриллы. Тем не менее анализ частот контактов между удаленными элементами генома с использова-

нием методов, основанных на перекрестном лигировании близкорасположенных фрагментов ДНК [113], продемонстрировал, что такие блоки все же существуют. Они получили название топологически-ассоциированных доменов (сокращенно – ТАДов) [114–116]. Размеры ТАДов существенно варьируют: в среднем они составляют ~ 1000 т.п.н. в геномах мыши и человека [115, 117] и ~ 100 т.п.н. в геноме дрозофилы [116]. Основной характеристикой ТАДов является то, что пространственные контакты равноудаленных фрагментов ДНК существенно чаще происходят внутри ТАДов, чем между ними.

ТАДы обычно представляют в виде компактных хроматиновых глобул (рис. 2, а). Хроматиновые глобулы, содержащие ~ 1000 т.п.н. ДНК, действительно легко видеть в интерфазных ядрах при анализе упаковки хроматина с помощью микроскопии сверхвысокого разрешения [118, 119]. С использованием техники визуализации ТАДов посредством гибридизации *in situ* с бакмидными пробами или наборами олигонуклеотидных проб было продемонстрировано, что ТАДы действительно имеют в первом приближении глобулярную форму [120, 121]. У дрозофилы можно наблюдать хорошее со-

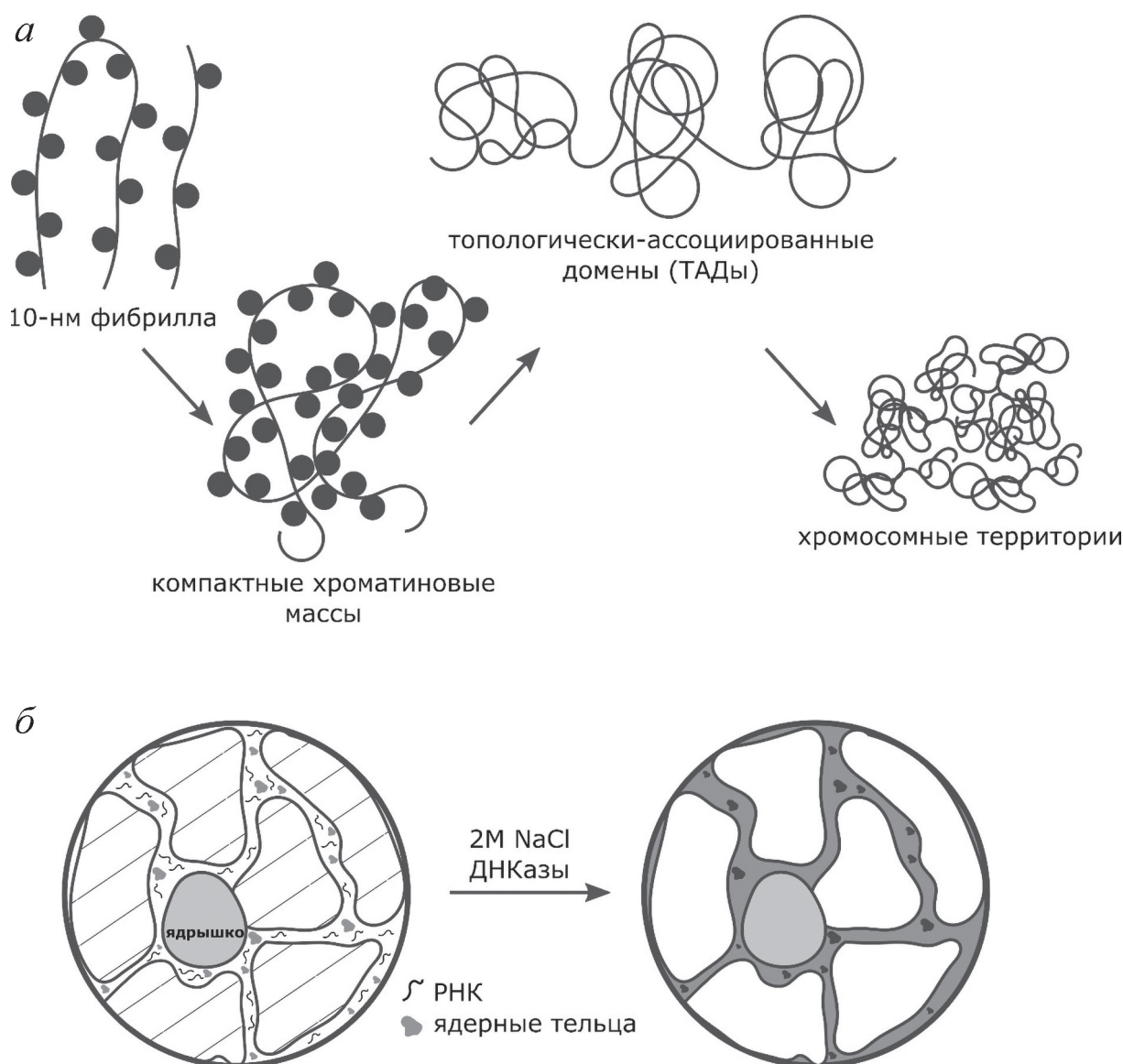


Рис. 2. Современные представления об укладке интерфазных хромосом в клеточном ядре. а – Организация 10-нм хроматиновой фибриллы в топологически-ассоциированные домены и далее в хромосомную территорию. б – Возникновение ядерного матрикса в результате агрегации содержимого интерхроматиновых каналов. Слева показана упрощенная модель организации хромосомных территорий (заштрихованные участки), разделенных интерхроматиновым компартментом. В интерхроматиновом компартменте находятся РНП-частицы и различные ядерные тельца (в том числе спеклы и транскрипционные фабрики). После обработки ядер DNКазой и солевой экстракции происходит солубилизация хроматина и агрегация содержимого интерхроматинового компартмента. Ядерные тельца оказываются включены в состав нерастворимого агрегата, который и называли ядерным матриксом

ответствие между ТАДами, выявляемыми на популяционных картах Hi-C, и индивидуальными глобулами, которые можно визуализировать посредством гибридизации *in situ* с соответствующими пробами [120]. У человека такое соответствие выражено намного хуже и становится очевидным лишь при усреднении результатов FISH на большом числе клеток [121]. Это хорошо согласуется с данными Hi-C на индивидуальных клетках, которые свидетельствуют о том, что менее 50% границ ТАДов совпадают между отдельными клетками [122].

Существуют убедительные свидетельства того, что в клетках позвоночных животных ТАДы формируются посредством динамической экструзии хроматиновых петель когезиновыми комплексами, которая ограничивается конвергентными сайтами связывания инсуляторного белка CTCF [123–125]. В границах ТАДов ДНК часто оказывается организованной в дополнительные петли различной природы, в том числе петли между сайтами связывания CTCF, энхансер-промоторные петли и петли между сайтами связывания репрессирующих транскрипцию комплексов Polycomb [117, 126].

Важной особенностью современной модели пространственной организации хромосом в клеточном ядре является то, что эта модель не предполагает наличия какой-либо непрерывной скелетной структуры (ядерного матрикса), участвующей в пространственной организации генома в интерфазном ядре. Петли ДНК, о которых говорилось выше, замыкаются благодаря взаимодействиям между привлеченными к их основаниям белками. В случае энхансер-промоторных петель существенную роль играет формирование активаторных фазовых конденсатов на энхансерах, к которым привлекаются промоторы [110]. То, что ранее называли ядерным матриксом, в действительности также является жидкофазным конденсатом, основу которого составляют гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые частицы (hnRNP), которые заполняют интерхроматиновые каналы [127]. В ходе солевой экстракции ядер hnRNP-частицы агрегируют, захватывая находящиеся в интерхроматиновых каналах функциональные компартменты, в том числе центры сплайсинга (спеклы) и транскрипционные фабрики, к которым привлекаются активные гены (рис. 2, б) [87]. Таким образом формируется нерастворимый ядерный матрикс. Это объясняет, почему удерживаемая в составе ядерного матрикса фракция ДНК оказывается обогащена активными генами (см. выше). В недавно опубликованной работе процедуру, идентичную процедуре выделения ядерного

матрикса, предложили использовать для выделения ДНК, ассоциированной со спеклами [128]. Полученная авторами этой работы фракция ДНК демонстрировала те же характеристики, что изучавшаяся ранее фракция ДНК, прилежащая к ядерному матриксу [14, 128]. Пограничные участки ТАДов содержат активный хроматин [115, 129], который предпочтительно локализуется на границах интерхроматиновых каналов [130]. Соответственно, они также будут удерживаться в составе формирующегося в ходе солевой экстракции агрегата hnRNP-частиц.

Интересным представляется вопрос о том, по каким позициям происходит описанная в предыдущем разделе крупномасштабная фрагментация генома на начальных стадиях апоптоза и при обработке клеток ингибиторами ДНК-топоизомеразы II. Ряд наблюдений позволяет считать, что в этих условиях геном разрезается по границам ТАДов. Прежде всего, было продемонстрировано, что ДНК-топоизомераза II предпочтительно связывается с границами ТАДов, где она колокализуется с CTCF и когезином [131]. Кроме того, границы ТАДов содержат активный хроматин, повсеместно транскрибирующиеся гены и кластеры регуляторных элементов [115, 129]. Соответственно, границы ТАДов предпочтительно доступны для нуклеаз. Наконец, в границах ТАДов часто располагаются ранние участки начала репликации ДНК [132]. Это коррелирует с предшествующими наблюдениями, продемонстрировавшими, что участки начала репликации находятся в пограничных областях так называемых «структурных» (не связанных с осуществлением транскрипции) петель ДНК [133]. На модели домена альфа-глобиновых генов кур было показано, что сайт предпочтительного расщепления ДНК при ингибировании активности ДНК-топоизомеразы II локализуется рядом с участком начала репликации [68]. На первый взгляд, предположение о том, что крупномасштабная фрагментация генома происходит по границам ТАДов, противоречит существующим оценкам размеров прикрепленных к ядерному матриксу/скелету петель ДНК. Действительно, наиболее часто размер этих петель оценивается в 50–100 т.п.н. [14], что на порядок меньше среднего размера ТАДов в клетках млекопитающих [115]. Однако стоит принять во внимание гетерогенность хроматиновых петель, которые изучались в ранних работах [40], а также ограничения, присущие каждому методу оценки размеров петель ДНК [14]. Так, есть все основания полагать, что при спрединге дегистонизированных ядер и метафазных хромосом повреждаются наиболее длинные петли. Так что

оценка контурной длины петель на электронно-микроскопических снимках явно должна быть заниженной. Отдельно стоит сказать про метафазные хромосомы. В рамках первоначально сформулированной радиально-петлевой модели хромосомы было принято считать, что организация ДНК в петли является общей для интерфазной и метафазной хромосомы [134]. Дополнительная компактизация хромосомы при переходе из интерфазы к метафазе объяснялась реконfigurацией скелетных элементов, к которым прикреплены петли. В настоящее время продемонстрировано, что петли ДНК в метафазной хромосоме формируются заново посредством экструзии, осуществляемой конденсинами [135, 136]. При этом утрачивается организация ДНК в ТАДы. Характеристики сформированных петель, в том числе и их размеры (80 т.п.н. [135]), существенно отличаются от характеристик петель ДНК в интерфазной хромосоме. Таким образом, усредненные оценки длины петель ДНК в интерфазных и метафазных хромосомах не имеют смысла. Природа скелетных элементов метафазной хромосомы и ядерного матрикса также принципиально различна. Первые формируются из конденсина и ДНК-топоизомеразы II [137, 138], тогда как ядерный матрикс состоит преимущественно из белков hnRNP-частиц, ламинов и компонентов ядрышка [139, 140]. Возвращаясь к интерфазным хромосомам, стоит упомянуть о том, что первоначальные оценки размеров топологически-замкнутых доменов генома (петель ДНК в нуклеоидах) составляли ~ 1500 т.п.н. [6], что вполне соответствует размеру топологически-ассоциированных доменов в хромосомах млекопитающих [115]. При этом стоит отметить, что ТАДы достаточно гетерогенны по размерам. Анализ Hi-C-матриц высокого разрешения продемонстрировал, что существуют и достаточно маленькие ТАДы [117].

В рамках современной модели организации генома ТАДы рассматриваются как его эволюционные блоки [141–143]. Аналогия с тем, что говорилось ранее о закрепленных на ядерном матриксе петлях ДНК [92, 93], вполне очевидна.

НОВАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЛОКОВ ГЕНОМА

Современная модель работы энхансеров постулирует, что на энхансере формируется жидкофазный активаторный конденсат [144–147]. Для того чтобы энхансер мог активировать промотор, последний должен находиться

внутри активаторного конденсата. В большинстве случаев это достигается посредством выпетливания разделяющего промотор и энхансер фрагмента ДНК [148, 149]. Учитывая то обстоятельство, что пространственные контакты удаленных фрагментов генома возникают предпочтительно внутри ТАДов, можно ожидать, что ТАДы будут ограничивать сферу действия энхансеров. Действительно, в ряде работ было продемонстрировано, что удаление либо перемещение границ ТАДов в результате хромосомных делеций и инверсий приводит к изменению профилей транскрипции, что, в свою очередь, может стать причиной различных заболеваний [150–153]. Наряду с этим в экспериментах со случайной интеграцией в геном конструкта с репортерным геном было показано, что энхансер способен эффективно активировать промотор только в тех случаях, когда интеграция произошла в тот же ТАД, в котором находится энхансер [154]. Перечисленные результаты привели к возрождению модели построения генома из структурно-функциональных блоков, каковыми стали считать ТАДы [143, 155–158]. В этой связи хотелось бы отметить, что одним из ключевых постулатов сформулированной в 80-е годы прошлого века модели доменной организации генома являлось утверждение о том, что домен в целом является регуляторным блоком, статус которого может быть активным, либо неактивным. Далее постулировалось, что должны существовать регуляторные элементы доменного уровня, которые контролируют транскрипционный статус домена. В качестве примера таких регуляторных элементов обычно приводили область контроля локуса домена бета-глобиновых генов позвоночных животных [27, 159, 160]. Ясно, что ТАДы не соответствуют этим двум постулатам. Действительно, ТАД в целом не является регуляторным доменом, транскрипционный статус которого регулируется посредством изменения способа компактизации ДНК в границах всего ТАДа. Соответственно, не обнаружено и регуляторных элементов, контролирующих способ укладки ДНК внутри ТАДа. Говоря о регуляторном значении разделения генома на ТАДы, часто подчеркивают консервативность их профилей [115, 143], однако консервативность эта является весьма ограниченной. Так, при сравнении организации в ТАДы геномов человека и шимпанзе было выявлено лишь около 40% консервативных границ [161]. Стоит отметить и то, что в индивидуальных клетках профили разделения хромосом на ТАДы существенно различаются: меньше половины границ ТАДов в индивидуальных клетках со-

впадает со среднестатистическими границами, выявленными при анализе популяций клеток мыши или дрозофилы [122, 162]. Способность границ ТАДов препятствовать установлению энхансер-промоторной коммуникации также является относительной. Вероятность пространственных контактов внутри ТАДов лишь в два раза превышает вероятность контактов равноудаленных геномных элементов из разных ТАДов [163]. Описаны ситуации, когда энхансер и активируемый этим энхансером ген находятся в разных ТАДах [164]. В некоторых областях генома утрата границ ТАДов приводит к изменениям профилей транскрипции [165, 166], тогда как в других областях генома они не имеют выраженного эффекта [167, 168]. Утрата всех границ ТАДов в результате деплеции CTCF либо когезина не приводит к драматическим изменениям профилей транскрипции [169–172]. Складывается впечатление, что поддержание определенной пространственной конфигурации сегмента ДНК внутри ТАДа имеет большее функциональное значение, чем ограничение сферы действия энхансеров границами ТАДов [168, 173, 174].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформулированная в 1980-е годы доменная модель организации эукариотического генома претерпела существенные изменения по ходу появления новых данных о пространственной организации генома в клеточном ядре. Привлекательность оригинальной версии этой модели [23, 24] состояла в том, что она позволяла рассчитывать на то, что понять механизм ра-

боты генома в целом можно изучая отдельные его домены. Сейчас очевидно, что такой подход оказался несостоятельным в том смысле, что геном нельзя представить в виде мозаики единообразно устроенных структурно-функциональных блоков. Хотя ТАДы в определенном смысле являются структурно-функциональными блоками генома, они не являются единообразно устроенными регуляторными доменами, которые могут активироваться или инактивироваться по принципу «все или ничего». Изучение регуляторных механизмов транскрипции на уровне всего генома демонстрирует существование множества индивидуальных решений, которые едва ли возможно уложить в некую общую модель.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в выработке концепции и написании обзора.

Финансирование. Работа С.В. Разина и О.Л. Кантидзе поддержана Российским научным фондом (грант № 21-64-00001). Работа И.В. Жегаловой поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-34-90058).

Благодарности. Исследование выполнено в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

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. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974) Spheroid chromatin units ([nu] bodies), *Science*, **183**, 330-332, doi: 10.1126/science.183.4122.330.
2. Axel, R. (1975) Cleavage of DNA in nuclei and chromatin with staphylococcal nuclease, *Biochemistry*, **14**, 2921-2925, doi: 10.1021/bi00684a020.
3. Finch, J. T., and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1897-1901, doi: 10.1073/pnas.73.6.1897.
4. Rydberg, B., Holley, W. R., Mian, I. S., and Chatterjee, A. (1998) Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber, *J. Mol. Biol.*, **284**, 71-84, doi: 10.1006/jmbi.1998.2150.
5. Cook, P. R., Brazell, I. A., and Jost, E. (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, *J. Cell. Sci.*, **22**, 303-324, doi: 10.1242/jcs.22.2.303.
6. Cook, P. R., and Brazell, I. A. (1975) Supercoils in human DNA, *J. Cell. Sci.*, **19**, 261-279, doi: 10.1242/jcs.19.2.261.
7. Berezney, R., and Coffey, D. S. (1975) Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA, *Science*, **189**, 291-293, doi: 10.1126/science.1145202.
8. Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1985) Transcription occurs at a nucleoskeleton, *EMBO J.*, **4**, 919-925, doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03719.x.
9. Benyajati, C., and Worcel, A. (1976) Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*, *Cell*, **9**, 393-407, doi: 10.1016/0092-8674(76)90084-2.

10. Igo-Kemennes, T., and Zachau, H. G. (1977) Domains in chromatin structure, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 109-118.
11. Razin, S. V., Mantieva, V. L., and Georgiev, G. P. (1979) The similarity of DNA sequences remaining bound to scaffold upon nuclease treatment of interphase nuclei and metaphase chromosomes, *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1713-1735, doi: 10.1093/nar/7.6.1713.
12. Adolph, K. W., Chang, S. M., and Laemmli, U. K. (1977) Role of nonhistone proteins in metaphase chromosomes structure, *Cell*, **12**, 805-816, doi: 10.1016/0092-8674(77)90279-3.
13. Hancock, R., and Hughes, M. E. (1982) Organization of DNA in the eukaryotic nucleus, *Biol. Cell*, **44**, 201-212.
14. Razin, S. V., Gromova, I. I., and Iarovaia, O. V. (1995) Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions, *Int. Rev. Cytol.*, **162B**, 405-448, doi: 10.1016/s0074-7696(08)62623-6.
15. Mullenders, L. H., van Zeeland, A. A., and Natarajan, A. T. (1983) Comparison of DNA loop size and super-coiled domain size in human cells, *Mutat. Res.*, **112**, 245-252, doi: 10.1016/0167-8817(83)90010-x.
16. Pienta, K. J., and Coffey, D. S. (1984) A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome, *J. Cell Sci. Suppl.*, **1**, 123-135, doi: 10.1242/jcs.1984.supplement_1.9.
17. Borland, L., Harauz, G., Bahr, G., and van Heel, M. (1988) Packing of the 30 nm chromatin fiber in the human metaphase chromosome, *Chromosoma*, **97**, 159-163, doi: 10.1007/BF00327373.
18. Getzenberg, R. H., Pienta, K. J., Ward, W. S., and Coffey, D. S. (1991) Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA, *J. Cell Biochem.*, **47**, 289-299, doi: 10.1002/jcb.240470402.
19. Weintraub, H., and Groudine, M. (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation, *Science*, **73**, 848-856, doi: 10.1126/science.948749.
20. Stalder, J., Larsen, A., Engel, J. D., Dolan, M., Groudine, M., et al. (1980) Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNAase I, *Cell*, **20**, 451-460, doi: 10.1016/0092-8674(80)90631-5.
21. Lawson, G. M., Knoll, B. J., March, C. J., Woo, S. L. C., Tsai, M.-J., et al. (1982) Definition of 5' and 3' structural boundaries of the chromatin domain containing the ovalbumin multigene family, *J. Biol. Chem.*, **257**, 1501-1507, doi: 10.1016/S0021-9258(19)68221-9.
22. Lawson, G. M., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1980) Deoxyribonuclease I sensitivity of the nontranscribed sequences flanking the 5' and 3' ends of the ovomucoid gene and the ovalbumin and its related X and Y genes in hen oviduct nuclei, *Biochemistry*, **19**, 4403-4441, doi: 10.1021/bi00560a004.
23. Bodnar, J. W. (1988) A domain model for eukaryotic DNA organization: a molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution, *J. Theor. Biol.*, **132**, 479-507, doi: 10.1016/s0022-5193(88)80086-9.
24. Goldman, M. A. (1988) The chromatin domain as a unit of gene regulation, *Bioessays*, **9**, 50-55, doi: 10.1002/bies.950090204.
25. Razin, S. V., Iarovaia, O. V., Sjakste, N., Sjakste, T., Bagdoniene, L., et al. (2007) Chromatin domains and regulation of transcription, *J. Mol. Biol.*, **369**, 597-607, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.003.
26. Grosveld, F., van Assandelt, G. B., Greaves, D. R., and Kollias, B. (1987) Position-independent, high-level expression of the human b-globin gene in transgenic mice, *Cell*, **51**, 975-985, doi: 10.1016/0092-8674(87)90584-8.
27. Forrester, W. C., Epner, E., Driscoll, M. C., Enver, T., Brice, M., et al. (1990) A deletion of the human b-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire b-globin locus, *Genes Dev.*, **4**, 1637-1649, doi: 10.1101/gad.4.10.1637.
28. Razin, S. V. (1996) Functional architecture of chromosomal DNA domains, *Crit. Rev. Eukar. Gene Expr.*, **6**, 247-269, doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v6.i2-3.70.
29. Cook, P. R., and Brazell, I. A. (1980) Mapping sequences in loops of nuclear DNA by their progressive detachment from the nuclear cage, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2895-2907, doi: 10.1093/nar/8.13.2895.
30. Robinson, S. I., Nelkin, B. D., and Vogelstein, B. (1982) The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells, *Cell*, **28**, 99-106, doi: 10.1016/0092-8674(82)90379-8.
31. Robinson, S. I., Small, D., Idzerda, R., McKnight, G. S., and Vogelstein, B. (1983) The association of active genes with the nuclear matrix of the chicken oviduct, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5113-5130, doi: 10.1093/nar/11.15.5113.
32. Small, D., Nelkin, B., and Vogelstein, B. (1985) The association of transcribed genes with the nuclear matrix of *Drosophila* cells during heat shock, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 2413-2431.
33. Cook, P. R. (1989) The nucleoskeleton and the topology of transcription, *Eur. J. Biochem.*, **185**, 487-501, doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15141.x.
34. Cook, P. R. (1991) The nucleoskeleton and the topology of replication, *Cell*, **66**, 627-635, doi: 10.1016/0092-8674(91)90109-c.
35. Cook, P. R. (1999) The organization of replication and transcription, *Science*, **284**, 1790-1795, doi: 10.1126/science.284.5421.1790.
36. Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei, *J. Cell Sci.*, **109 (Pt 6)**, 1427-1436, doi: 10.1242/jcs.109.6.1427.
37. Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton, *Cell*, **73**, 361-373, doi: 10.1016/0092-8674(93)90235-i.
38. Cook, P. R., and Marenduzzo, D. (2018) Transcription-driven genome organization: a model for chromosome structure and the regulation of gene expression tested through simulations, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 9895-9906, doi: 10.1093/nar/gky763.

39. Bertero, A. (2021) RNA biogenesis instructs functional inter-chromosomal genome architecture, *Front. Genet.*, **12**, 645863, doi: 10.3389/fgene.2021.645863.
40. Razin, S. V. (1987) DNA interaction with the nuclear matrix and spatial organization of replication and transcription, *BioEssays*, **6**, 19-23, doi: 10.1002/bies.950060106.
41. Mirkovitch, J., Mirault, M.-E., and Laemmli, U. K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold, *Cell*, **39**, 223-232, doi: 10.1016/0092-8674(84)90208-3.
42. Cockerill, P. N., and Garrard, W. T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites, *Cell*, **44**, 273-282, doi: 10.1016/0092-8674(86)90761-0.
43. Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., et al. (1995) Scaffold/matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci, *Int. Rev. Cytol.*, **162A**, 389-454, doi: 10.1016/s0074-7696(08)61235-8.
44. Mirkovitch, J., Spierer, P., and Laemmli, U. K. (1986) Genes and loops in 320,000 base-pairs of the *Drosophila melanogaster* chromosome, *J. Mol. Biol.*, **190**, 255-258, doi: 10.1016/0022-2836(86)90296-2.
45. Gasser, S. M., and Laemmli, U. K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*, *Cell*, **46**, 521-530, doi: 10.1016/0092-8674(86)90877-9.
46. Schwartz, Y. B., Ioudinkova, E. S., Demakov, S. A., Razin, S. V., and Zhimulev, I. F. (1999) Interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes contain matrix association regions, *J. Cell Biochem.*, **72**, 368-372, doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990301)72:3<368::AID-JCB6>3.0.CO;2-C.
47. Levy-Wilson, B., and Fortier, C. (1989) The limits of the DNase I-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene, *J. Biol. Chem.*, **264**, 21196-22204, doi: 10.1016/S0021-9258(19)30066-3.
48. Pathak, R. U., Srinivasan, A., and Mishra, R. K. (2014) Genome-wide mapping of matrix attachment regions in *Drosophila melanogaster*, *BMC Genomics*, **15**, 1022, doi: 10.1186/1471-2164-15-1022.
49. Liebich, I., Bode, J., Reuter, I., and Wingender, E. (2002) Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs), *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3433-3442, doi: 10.1093/nar/gkf446.
50. Boulikas, T. (1992) Homeotic protein binding sites, origins of replication, and nuclear matrix anchorage sites share the ATTA and ATTTA motifs, *J. Cell Biochem.*, **50**, 111-123, doi: 10.1002/jcb.240500202.
51. Gasser, S. M., and Laemmli, U. K. (1986) The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site, *EMBO J.*, **5**, 511-518, doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04240.x.
52. Adachi, Y., Käs, E., and Laemmli, U. K. (1989) Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions, *EMBO J.*, **8**, 3997-4006, doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08582.x.
53. Bode, J., Winkelmann, S., Gotze, S., Spiker, S., Tsutsui, K., et al. (2006) Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy, *J. Mol. Biol.*, **358**, 597-613, doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.073.
54. Attal, J., Cajero-Juarez, M., Petitclerc, D., Theron, M. C., Stinnakre, M. G., et al. (1995) The effect of matrix attached regions (MAR) and specialized chromatin structure (SCS) on the expression of gene constructs in cultured cells and in transgenic mice, *Mol. Biol. Rep.*, **22**, 37-46, doi: 10.1007/BF00996303.
55. McKnight, R. A., Shamay, A., Sankaran, L., Wall, R. J., and Hennighausen, L. (1992) Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6943-6947, doi: 10.1073/pnas.89.15.6943.
56. De Bolle, M. F., Butaye, K. M., Goderis, I. J., Wouters, P. F., Jacobs, A., et al. (2007) The influence of matrix attachment regions on transgene expression in *Arabidopsis thaliana* wild type and gene silencing mutants, *Plant Mol. Biol.*, **63**, 533-543, doi: 10.1007/s11103-006-9107-x.
57. Kellum, R., and Schedl, P. (1992) A group of scs elements function as boundaries in enhancer-blocking assay, *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2424-2431, doi: 10.1128/mcb.12.5.2424.
58. Zhao, C. P., Guo, X., Chen, S. J., Li, C. Z., Yang, Y., et al. (2017) Matrix attachment region combinations increase transgene expression in transfected Chinese hamster ovary cells, *Sci. Rep.*, **7**, 42805, doi: 10.1038/srep42805.
59. Ji, L., Xu, R., Lu, L., Zhang, J., Yang, G., et al. (2013) TM6, a novel nuclear matrix attachment region, enhances its flanking gene expression through influencing their chromatin structure, *Mol. Cells*, **36**, 127-137, doi: 10.1007/s10059-013-0092-z.
60. Fukuda, Y., and Nishikawa, S. (2003) Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease, *Plant Mol. Biol.*, **51**, 665-675, doi: 10.1023/a:1022509909838.
61. Izaurrealde, E., Mirkovich, J., and Laemmli, U. K. (1988) Interaction of DNA with nuclear scaffolds *in vitro*, *J. Mol. Biol.*, **200**, 111-125, doi: 10.1016/0022-2836(88)90337-3.
62. Wang, T. Y., Han, Z. M., Chai, Y. R., and Zhang, J. H. (2010) A mini review of MAR-binding proteins, *Mol. Biol. Rep.*, **37**, 3553-3560, doi: 10.1007/s11033-010-0003-8.
63. Naik, R., and Galande, S. (2019) SATB family chromatin organizers as master regulators of tumor progression, *Oncogene*, **38**, 1989-2004, doi: 10.1038/s41388-018-0541-4.
64. Marena, M., Lazarova, E., and Gilbert, N. (2022) The role of SAF-A/hnRNP U in regulating chromatin structure, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **72**, 38-44, doi: 10.1016/j.gde.2021.10.008.
65. Chattopadhyay, S., and Pavithra, L. (2007) MARs and MARBPs: key modulators of gene regulation and disease manifestation, *Subcell Biochem.*, **41**, 213-230.

66. Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, **37**, 67-75, doi: 10.1016/0092-8674(84)90301-5.
67. Razin, S. V., Hancock, R., Iarovaia, O., Westergaard, O., Gromova, I., et al. (1993) Structural-functional organization of chromosomal DNA domains, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **58**, 25-35, doi: 10.1101/sqb.1993.058.01.006.
68. Razin, S. V., Petrov, P., and Hancock, R. (1991) Precise localization of the α -globin gene cluster within one of the 20- to 300-Kilobase DNA fragment released by cleavage of chicken chromosomal DNA at topoisomerase II site *in vivo*: evidence that the fragment are DNA loops or domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8515-8519, doi: 10.1073/pnas.88.19.8515.
69. Liu, L. F. (1983) DNA topoisomerases – enzymes that catalyse the breaking and rejoining of DNA, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **15**, 1-24, doi: 10.3109/10409238309102799.
70. Liu, L. F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 351-375, doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.002031.
71. Berrios, M., Osheroff, N., and Fischer, P. A. (1985) In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4142-4146, doi: 10.1073/pnas.82.12.4142.
72. Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., and Laemmli, U. K. (1986) Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II, *J. Mol. Biol.*, **188**, 613-629, doi: 10.1016/s0022-2836(86)80010-9.
73. Nedospasov, S. A., and Georgiev, G. P. (1980) Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 532-539, doi: 10.1016/0006-291x(80)90366-6.
74. Gromova, I. I., Thomsen, B., and Razin, S. V. (1995) Different topoisomerase II antitumor drugs direct similar specific long-range fragmentation of an amplified c-MYC gene locus in living cells and in high-salt-extracted nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 102-106, doi: 10.1073/pnas.92.1.102.
75. Iarovaia, O., Hancock, R., Lagarkova, M., Miassod, R., and Razin, S. V. (1996) Mapping of genomic DNA loop organization in a 500-kilobase region of the *Drosophila* X chromosome by the topoisomerase II-mediated DNA loop excision protocol, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 302-308, doi: 10.1128/mcb.16.1.302.
76. Iarovaia, O. V., Bystritskiy, A., Ravcheev, D., Hancock, R., and Razin, S. V. (2004) Visualization of individual DNA loops and a map of loop-domains in the human dystrophin gene, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2079-2086, doi: 10.1093/nar/gkh532.
77. Lagarkova, M. A., Iarovaia, O. V., and Razin, S. V. (1995) The large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers, *J. Biol. Chem.*, **270**, 20239-20241, doi: 10.1074/jbc.270.35.20239.
78. Solovyan, V. T., Bezvenyuk, Z. A., Salminen, A., Austin, C. A., and Courtney, M. J. (2002) The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 21458-21467, doi: 10.1074/jbc.M110621200.
79. Bezvenyuk, Z., Salminen, A., and Solovyan, V. (2000) Excision of DNA loop domains as a common step in caspase-dependent and -independent types of neuronal cell death, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **81**, 191-196, doi: 10.1016/s0169-328x(00)00174-1.
80. Rho, J. H., Kang, D. Y., Park, K. J., Choi, H. J., Lee, H. S., et al. (2005) Doxorubicin induces apoptosis with profile of large-scale DNA fragmentation and without DNA ladder in anaplastic thyroid carcinoma cells via histone hyperacetylation, *Int. J. Oncol.*, **27**, 465-471, doi: 10.3892/ijo.27.2.465.
81. Li, T. K., Chen, A. Y., Yu, C., Mao, Y., Wang, H., et al. (1999) Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress, *Genes Dev.*, **13**, 1553-1560, doi: 10.1101/gad.13.12.1553.
82. Gromova, I. I., Nielsen, O. F., and Razin, S. V. (1995) Long-range fragmentation of the eukaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18685-18690, doi: 10.1074/jbc.270.31.18685.
83. Lagarkova, M. A., Iarovaia, O. V., and Razin, S. V. (1995) Excision of chromosomal DNA loops by pretreatment of permeabilised cells with Bal 31 nuclease, *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 253-256, doi: 10.1007/BF00290373.
84. Sotolongo, B., Huang, T. T., Isenberger, E., and Ward, W. S. (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments, *J. Androl.*, **26**, 272-280, doi: 10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x.
85. Hancock, R. (2000) A new look at the nuclear matrix, *Chromosoma*, **109**, 219-225, doi: 10.1007/s004120000077.
86. Pederson, T. (2000) Half a century of “the nuclear matrix”, *Mol. Biol. Cell*, **11**, 799-805, doi: 10.1091/mbc.11.3.799.
87. Razin, S. V., Iarovaia, O. V., and Vassetzky, Y. S. (2014) A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus, *Chromosoma*, **123**, 217-224, doi: 10.1007/s00412-014-0459-8.
88. Svetlova, E. Y., Razin, S. V., and Debatisse, M. (2001) Mammalian recombination hot spot and DNA loop anchorage region: a model for the study of common fragile sites, *J. Cell. Biochem.*, **S36**, 170-178, doi: 10.1002/jcb.1081.
89. Stanulla, M., Wang, J., Chervinsky, D. S., Thandla, S., and Aplan, P. D. (1997) DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, **17**, 4070-4079, doi: 10.1128/MCB.17.7.4070.
90. Aplan, P. D., Chervinsky, D. S., Stanulla, M., and Burhans, W. C. (1996) Site-specific DNA cleavage

- within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors, *Blood*, **87**, 2649-2658.
91. Felix, C. A. (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 233-255, doi: 10.1016/s0167-4781(98)00139-0.
 92. Razin, S. V. (1999) Chromosomal DNA loops may constitute basic units of the genome organization and evolution, *Crit. Rev. Eukar. Gene Exp.*, **9**, 279-283, doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v9.i3-4.120.
 93. Kantidze, O. L., and Razin, S. V. (2009) Chromatin loops, illegitimate recombination, and genome evolution, *Bioessays*, **31**, 278-286, doi: 10.1002/bies.200800165.
 94. Lawrence, J. B., Singer, R. H., and McNeil, J. A. (1990) Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene, *Science*, **249**, 928-932, doi: 10.1126/science.2203143.
 95. Hu, Y., Kireev, I., Plutz, M., Ashourian, N., and Belmont, A. S. (2009) Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template, *J. Cell Biol.*, **185**, 87-100, doi: 10.1083/jcb.200809196.
 96. Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., et al. (2012) Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres, *EMBO Rep.*, **13**, 992-996, doi: 10.1038/embor.2012.139.
 97. Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., et al. (2012) Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure, *EMBO J.*, **31**, 1644-1653, doi: 10.1038/emboj.2012.35.
 98. Eltsov, M., Maclellan, K. M., Maeshima, K., Frangakis, A. S., and Dubochet, J. (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19732-19737, doi: 10.1073/pnas.0810057105.
 99. Maeshima, K., Imai, R., Hikima, T., and Joti, Y. (2014) Chromatin structure revealed by X-ray scattering analysis and computational modeling, *Methods*, **70**, 154-161, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.08.008.
 100. Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., et al. (2012) Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber, *Nucleus*, **3**, 404-410, doi: 10.4161/nucl.21222.
 101. Razin, S. V., and Gavrilov, A. A. (2014) Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding, *Epigenetics*, **9**, 653-657, doi: 10.4161/epi.28297.
 102. Itoh, Y., Woods, E. J., Minami, K., Maeshima, K., and Collepardo-Guevara, R. (2021) Liquid-like chromatin in the cell: what can we learn from imaging and computational modeling? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **71**, 123-135, doi: 10.1016/j.sbi.2021.06.004.
 103. Maeshima, K., Ide, S., Hibino, K., and Sasai, M. (2016) Liquid-like behavior of chromatin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **37**, 36-45, doi: 10.1016/j.gde.2015.11.006.
 104. Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C. G., Tamura, S., Tani, T., et al. (2013) Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells, *Nucleus*, **4**, 349-356, doi: 10.4161/nucl.26053.
 105. Hansen, J. C., Connolly, M., McDonald, C. J., Pan, A., Pryamkova, A., et al. (2018) The 10-nm chromatin fiber and its relationship to interphase chromosome organization, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 67-76, doi: 10.1042/BST20170101.
 106. Allahverdi, A., Yang, R., Korolev, N., Fan, Y., Davey, C. A., et al. (2011) The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1680-1691, doi: 10.1093/nar/gkq900.
 107. Laghmach, R., Di Pierro, M., and Potoyan, D. (2021) A liquid state perspective on dynamics of chromatin compartments, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 781981, doi: 10.3389/fmolb.2021.781981.
 108. Lee, R., Kang, M. K., Kim, Y. J., Yang, B., Shim, H., et al. (2022) CTCF-mediated chromatin looping provides a topological framework for the formation of phase-separated transcriptional condensates, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 207-226, doi: 10.1093/nar/gkab1242.
 109. Rippe, K., and Papantonis, A. (2021) RNA polymerase II transcription compartments: from multivalent chromatin binding to liquid droplet formation? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 645-646, doi: 10.1038/s41580-021-00401-6.
 110. Razin, S. V., and Gavrilov, A. A. (2020) The role of liquid-liquid phase separation in the compartmentalization of cell nucleus and spatial genome organization, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 643-650, doi: 10.1134/S0006297920060012.
 111. Hansen, J. C., Maeshima, K., and Hendzel, M. J. (2021) The solid and liquid states of chromatin, *Epigenetics Chromatin*, **14**, 50, doi: 10.1186/s13072-021-00424-5.
 112. Strickfaden, H., Tolsma, T. O., Sharma, A., Underhill, D. A., Hansen, J. C., et al. (2020) Condensed chromatin behaves like a solid on the mesoscale in vitro and in living cells, *Cell*, **183**, 1772-1784.e1713, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.027.
 113. De Wit, E., and de Laat, W. (2012) A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization, *Genes Dev.*, **26**, 11-24, doi: 10.1101/gad.179804.111.
 114. Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., et al. (2012) Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre, *Nature*, **485**, 381-385, doi: 10.1038/nature11049.
 115. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., et al. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions, *Nature*, **485**, 376-380, doi: 10.1038/nature11082.
 116. Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., et al. (2012) Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome, *Cell*, **148**, 458-472, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.010.
 117. Rao, S. S., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., et al. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping, *Cell*, **159**, 1665-1680, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.021.

118. Smeets, D., Markaki, Y., Schmid, V. J., Kraus, F., Tattermusch, A., et al. (2014) Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci, *Epigenetics Chromatin*, **7**, 8, doi: 10.1186/1756-8935-7-8.
119. Cremer, T., Cremer, M., Hubner, B., Strickfaden, H., Smeets, D., et al. (2015) The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments, *FEBS Lett.*, **589**, 2931-2943, doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.037.
120. Szabo, Q., Jost, D., Chang, J. M., Cattoni, D. I., Papadopoulos, G. L., et al. (2018) TADs are 3D structural units of higher-order chromosome organization in *Drosophila*, *Sci. Adv.*, **4**, eaar8082, doi: 10.1126/sciadv.aar8082.
121. Bintu, B., Mateo, L. J., Su, J. H., Sinnott-Armstrong, N. A., Parker, M., et al. (2018) Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells, *Science*, **362**, doi: 10.1126/science.aau1783.
122. Flyamer, I. M., Gassler, J., Imakaev, M., Brandao, H. B., Ulianov, S. V., et al. (2017) Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition, *Nature*, **544**, 110-114, doi: 10.1038/nature21711.
123. Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., et al. (2016) Formation of chromosomal domains by loop extrusion, *Cell Rep.*, **15**, 2038-2049, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.085.
124. Sanborn, A. L., Rao, S. S., Huang, S. C., Durand, N. C., Huntley, M. H., et al. (2015) Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E6456-6465, doi: 10.1073/pnas.1518552112.
125. Davidson, I. F., and Peters, J. M. (2021) Genome folding through loop extrusion by SMC complexes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 445-464, doi: 10.1038/s41580-021-00349-7.
126. Cheutin, T., and Cavalli, G. (2014) Polycomb silencing: from linear chromatin domains to 3D chromosome folding, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **25**, 30-37, doi: 10.1016/j.gde.2013.11.016.
127. Razin, S. V., and Gavrilov, A. A. (2021) Non-coding RNAs in chromatin folding and nuclear organization, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 5489-5504, doi: 10.1007/s00018-021-03876-w.
128. Baudement, M. O., Cournac, A., Court, F., Seveno, M., Parrinello, H., et al. (2018) High-salt-recovered sequences are associated with the active chromosomal compartment and with large ribonucleoprotein complexes including nuclear bodies, *Genome Res.*, **28**, 1733-1746, doi: 10.1101/gr.237073.118.
129. Ulianov, S. V., Khrameeva, E. E., Gavrilov, A. A., Flyamer, I. M., Kos, P., et al. (2016) Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains, *Genome Res.*, **26**, 70-84, doi: 10.1101/gr.196006.115.
130. Cremer, T., Cremer, M., and Cremer, C. (2018) The 4D nucleome: genome compartmentalization in an evolutionary context, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 313-325, doi: 10.1134/S000629791804003X.
131. Uusküla-Reimand, L., Hou, H., Samavarchi-Tehrani, P., Vietri Rudan, M., Liang, M., et al. (2016) Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders, *Genome Biol.*, **17**, 182, doi: 10.1186/s13059-016-1043-8.
132. Emerson, D. J., Zhao, P. A., Cook, A. L., Barnett, R. J., Klein, K. N., et al. (2022) Cohesin-mediated loop anchors confine the locations of human replication origins, *Nature*, **606**, 812-819, doi: 10.1038/s41586-022-04803-0.
133. Razin, S. V., Kekelidze, M. G., Lukanidin, E. M., Scherrer, K., and Georgiev, G. P. (1986) Replication origins are attached to the nuclear skeleton, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8189-8207, doi: 10.1093/nar/14.20.8189.
134. Micheli, G., Luzzatto, A. R., Carri, M. T., de Capoa, A., and Pelliccia, F. (1993) Chromosome length and DNA loop size during early embryonic development of *Xenopus laevis*, *Chromosoma*, **102**, 478-483, doi: 10.1007/BF00357103.
135. Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B. R., et al. (2013) Organization of the mitotic chromosome, *Science*, **342**, 948-953, doi: 10.1126/science.1236083.
136. Golfier, S., Quail, T., Kimura, H., and Brugués, J. (2020) Cohesin and condensin extrude DNA loops in a cell cycle-dependent manner, *Elife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.53885.
137. Maeshima, K., and Laemmli, U. K. (2003) A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly, *Dev. Cell*, **4**, 467-480, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00092-3.
138. Meijering, A. E. C., Sarlos, K., Nielsen, C. F., Witt, H., Harju, J., et al. (2022) Nonlinear mechanics of human mitotic chromosomes, *Nature*, **605**, 545-550, doi: 10.1038/s41586-022-04666-5.
139. Mattern, K. A., Humbel, B. M., Muijsers, A. O., de Jong, L., and van Driel, R. (1996) hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells, *J. Cell Biochem.*, **62**, 275-289, doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199608)62:2<275::AID-JCB15>3.0.CO;2-K.
140. Martelli, A. M., Manzoli, L., Rubbini, S., Billi, A. M., Bareggi, R., et al. (1995) The protein composition of Friend cell nuclear matrix stabilized by various treatments. Different recovery of nucleolar proteins B23 and C23 and nuclear lamins, *Biol. Cell*, **83**, 15-22, doi: 10.1016/0248-4900(96)89927-8.
141. Liao, Y., Zhang, X., Chakraborty, M., and Emerson, J. J. (2021) Topologically associating domains and their role in the evolution of genome structure and function in *Drosophila*, *Genome Res.*, **31**, 397-410, doi: 10.1101/gr.266130.120.
142. Galupa, R., and Heard, E. (2017) Topologically associating domains in chromosome architecture and gene regulatory landscapes during development, disease, and evolution, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **82**, 267-278, doi: 10.1101/sqb.2017.82.035030.

143. Krefting, J., Andrade-Navarro, M. A., and Ibn-Salem, J. (2018) Evolutionary stability of topologically associating domains is associated with conserved gene regulation, *BMC Biol.*, **16**, 87, doi: 10.1186/s12915-018-0556-x.
144. Shrinivas, K., Sabari, B. R., Coffey, E. L., Klein, I. A., Boija, A., et al. (2019) Enhancer features that drive formation of transcriptional condensates, *Mol. Cell*, **75**, 549-561.e547, doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.009.
145. Sabari, B. R., Dall'Agnesse, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, doi: 10.1126/science.aar3958.
146. Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K., and Sharp, P. A. (2017) A phase separation model for transcriptional control, *Cell*, **169**, 13-23, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.007.
147. Serebreni, L., and Stark, A. (2021) Insights into gene regulation: from regulatory genomic elements to DNA-protein and protein-protein interactions, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **70**, 58-66, doi: 10.1016/j.ceb.2020.11.009.
148. Vernimmen, D., and Bickmore, W. A. (2015) The hierarchy of transcriptional activation: from enhancer to promoter, *Trends Genet.*, **31**, 696-708, doi: 10.1016/j.tig.2015.10.004.
149. Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., et al. (2015) Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C, *Nat. Genet.*, **47**, 598-606, doi: 10.1038/ng.3286.
150. Lupianez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., et al. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions, *Cell*, **161**, 1012-1025, doi: 10.1016/j.cell.2015.04.004.
151. Lupianez, D. G., Spielmann, M., and Mundlos, S. (2016) Breaking TADs: how alterations of chromatin domains result in disease, *Trends Genet.*, **32**, 225-237, doi: 10.1016/j.tig.2016.01.003.
152. Franke, M., Ibrahim, D. M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., et al. (2016) Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications, *Nature*, **538**, 265-269, doi: 10.1038/nature19800.
153. Valton, A. L., and Dekker, J. (2016) TAD disruption as oncogenic driver, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **36**, 34-40, doi: 10.1016/j.gde.2016.03.008.
154. Symmons, O., Uslu, V. V., Tsujimura, T., Ruf, S., Nassari, S., et al. (2014) Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains, *Genome Res.*, **24**, 390-400, doi: 10.1101/gr.163519.113.
155. Razin, S. V., and Ulianov, S. V. (2017) Gene functioning and storage within a folded genome, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **22**, 18, doi: 10.1186/s11658-017-0050-4.
156. Dekker, J., and Heard, E. (2015) Structural and functional diversity of topologically associating domains, *FEBS Lett.*, **589**, 2877-2884, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.044.
157. Le Dily, F., Bau, D., Pohl, A., Vicent, G. P., Serra, F., et al. (2014) Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation, *Genes Dev.*, **28**, 2151-2162, doi: 10.1101/gad.241422.114.
158. Le Dily, F., and Beato, M. (2015) TADs as modular and dynamic units for gene regulation by hormones, *FEBS Lett.*, **589**, 2885-2892, doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.026.
159. Razin, S. V., Farrell, C. M., and Recillas-Targa, F. (2003) Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level, *Int. Rev. Cytol.*, **226**, 63-125, doi: 10.1016/s0074-7696(03)01002-7.
160. 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 Expr.*, **11**, 227-242, doi: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v11.i1-3.110.
161. Eres, I. E., and Gilad, Y. (2021) A TAD skeptic: is 3D genome topology conserved? *Trends Genet.*, **37**, 216-223, doi: 10.1016/j.tig.2020.10.009.
162. Ulianov, S. V., Zakharova, V. V., Galitsyna, A. A., Kos, P. I., Polovnikov, K. E., et al. (2021) Order and stochasticity in the folding of individual Drosophila genomes, *Nat. Commun.*, **12**, 41, doi: 10.1038/s41467-020-20292-z.
163. McCord, R. P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P. S., Zhan, Y., et al. (2013) Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson–Gilford progeria syndrome, *Genome Res.*, **23**, 260-269, doi: 10.1101/gr.138032.112.
164. Beccari, L., Jaquier, G., Lopez-Delisle, L., Rodriguez-Carballo, E., Mascrez, B., et al. (2021) Dbx2 regulation in limbs suggests interTAD sharing of enhancers, *Dev. Dyn.*, **250**, 1280-1299, doi: 10.1002/dvdy.303.
165. Downen, J. M., Fan, Z. P., Hnisz, D., Ren, G., Abraham, B. J., et al. (2014) Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes, *Cell*, **159**, 374-387, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.030.
166. Hnisz, D., Day, D. S., and Young, R. A. (2016) Insulated neighborhoods: structural and functional units of mammalian gene control, *Cell*, **167**, 1188-1200, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.024.
167. Xiao, J. Y., Hafner, A., and Boettiger, A. N. (2021) How subtle changes in 3D structure can create large changes in transcription, *Elife*, **10**, doi: 10.7554/eLife.64320.
168. Despang, A., Schopflin, R., Franke, M., Ali, S., Jerkovic, I., et al. (2019) Functional dissection of the Sox9-Kcnj2 locus identifies nonessential and instructive roles of TAD architecture, *Nat. Genet.*, **51**, 1263-1271, doi: 10.1038/s41588-019-0466-z.
169. Nora, E. P., Goloborodko, A., Valton, A. L., Gibcus, J. H., Uebersohn, A., et al. (2017) Targeted degradation of CTCF decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization, *Cell*, **169**, 930-944.e922, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.004.
170. Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., et al. (2017) Two

- independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal, *Nature*, **551**, 51-56, doi: 10.1038/nature24281.
171. Rao, S. S. P., Huang, S. C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J. M., Perez, E. M., et al. (2017) Cohesin loss eliminates all loop domains, *Cell*, **171**, 305-320. e324, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.026.
172. Zuin, J., Dixon, J. R., van der Reijden, M. I., Ye, Z., Kolovos, P., et al. (2014) Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 996-1001, doi: 10.1073/pnas.1317788111.
173. Hanssen, L. L. P., Kassouf, M. T., Oudelaar, A. M., Biggs, D., Preece, C., et al. (2017) Tissue-specific CTCF-cohesin-mediated chromatin architecture delimits enhancer interactions and function *in vivo*, *Nat. Cell Biol.*, **19**, 952-961, doi: 10.1038/ncb3573.
174. Ulianov, S. V., Galitsyna, A. A., Flyamer, I. M., Golov, A. K., Khrameeva, E. E., et al. (2017) Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure, *Epigenetics Chromatin*, **10**, 35, doi: 10.1186/s13072-017-0142-4.

DOMAIN MODEL OF EUKARYOTIC GENOME ORGANIZATION: FROM DNA LOOPS FIXED ON THE NUCLEAR MATRIX TO TADs

Review

S. V. Razin^{1,2*}, I. V. Zhegalova^{3,4,5}, and O. L. Kantidze¹

¹ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: sergey.v.razin@inbox.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, 119991 Moscow, Russia*

³ *Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *A.A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, 127051 Moscow, Russia*

In this review we analyze the development of ideas about the domain organization of the eukaryotic genome. The results of characterization of DNA loops attached to the nuclear matrix are considered in detail and the place of these results in the modern model of the spatial organization of the eukaryotic genome is discussed. A critical analysis of the results demonstrating that topologically associated chromatin domains are structural and functional blocks of the genome is presented, and the conclusion is substantiated that these blocks are fundamentally different from the structural-functional domains considered by the domain hypothesis of the eukaryotic genome organization that was formulated in the 1980s. Based on the entire discussion, it is concluded that the model postulating that the eukaryotic genome is built from uniformly organized functional units has proved to be an unacceptable simplification.

Keywords: chromatin, structural and functional domains of the genome, topologically associated chromatin domains, DNA loops, DNA topoisomerase II

УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА p53

© 2022 М.Г. Шарапов*, Р.Г. Гончаров, С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова

*Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: sharapov.mg@yandex.ru*

Поступила в редакцию 11.05.2022

После доработки 22.06.2022

Принята к публикации 22.06.2022

Пероксиредоксин 6 (Prdx6) является важным антиоксидантным ферментом со множеством функций в клетке. Prdx6 нейтрализует широкий спектр гидропероксидов, участвует в метаболизме фосфолипидов и восстановлении мембран клетки, а также в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов. Нарушение нормальной экспрессии Prdx6 в клетке приводит к развитию патологических состояний. Снижение концентрации Prdx6 приводит к росту окислительных повреждений клетки. В то же время гиперпродукция Prdx6 ассоциируется с ростом антиоксидантного статуса, подавлением апоптоза и канцерогенезом. В настоящее время механизмы канцерогенного действия пероксиредоксинов недостаточно изучены. В данной работе установлено, что увеличение в 3–4 раза продукции Prdx6 в клетках эмбриональных фибробластов мыши 3T3 приводит к снижению в 4–5 раз уровня онкосупрессора p53. При этом гиперпродукция Prdx6 приводит к усилению экспрессии *RELA* и *HIF1A*, оказывающих онкогенный эффект. Рост внутриклеточного Prdx6 в 3–4 раза повышает интенсивность пролиферации клеток на 20–30%, способствует росту антиоксидантной активности на 30–50%, а также увеличивает радиорезистентность трансфицированных клеток 3T3 на 30–40%. Рост внутриядерного Prdx6 приводит к уменьшению экспрессии генов репарации ДНК в ответ на действие радиации, что указывает на снижение повреждений геномной ДНК. В работе обсуждаются возможные молекулярные механизмы подавления p53 при гиперпродукции Prdx6, которые могут найти применение в разработке новых подходов терапии рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин 6, p53, клеточная гибель, пролиферация клеток, окислительный стресс, ионизирующее излучение.

DOI: 10.31857/S0320972522070107, **EDN:** AWAZNN

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что в физиологических концентрациях активные формы кислорода (АФК) являются важнейшими внутриклеточными и межклеточными сигнальными молекулами [1]. Сигнально-регуляторная функция АФК реализуется через их влияние на «многоуровневую» редокс-чувствительную систему регуляторных белков клетки, которая представлена различными рецепторами, протеинкиназами, фосфатазами и транскрипционными факторами [2, 3].

Ключевую роль в процессах АФК-опосредованной сигнализации играют остатки цистеинов (Cys), доступные для окислительной модификации как в самих регуляторных белках, так и в белках-посредниках, известных как редокс-реле [4]. В свою очередь, уровень внутриклеточных и межклеточных АФК контролируется антиоксидантной системой. В регуляции концентрации АФК основную роль играют ферменты-антиоксиданты, среди которых особая роль принадлежит пероксиредоксинам (Prdx) — эволюционно-древнему семейству тиоредоксин-подобных перокси-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; карбокси-H₂DCFDA — 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат; AP-1 — транскрипционный фактор (Activating Protein-1); GFP — зелёный флуоресцентный белок; HIF-1 α — транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией (Hypoxia-inducible factor 1-alpha); NF- κ B — транскрипционный фактор (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); Nrf2 — транскрипционный фактор (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); p53 — транскрипционный фактор; Prdx — пероксиредоксин.

* Адресат для корреспонденции.

даз. Среди известных пероксидаз именно Prdx способны восстанавливать наиболее широкий спектр органических и неорганических гидропероксидов, являющихся наиболее стабильными и долгоживущими формами АФК [5]. Кроме того, Prdx при окислении пероксидазного активного центра проявляют функцию шаперонов и фосфолипаз, что также оказывает влияние на внутриклеточную сигнализацию и физиологию клетки [6]. Следует также отметить, что Prdx, помимо непосредственного участия в регуляции концентрации гидропероксидов, выполняют функцию редокс-реле, взаимодействуя с белками-мишенями и образуя с ними межмолекулярные дисульфидные связи [7, 8]. Например, транскрипционный фактор FOXO3 (Forkhead box O3) через остатки Cys31 и Cys150 взаимодействует с Prdx1, что защищает FOXO3 от деградации, способствует его проникновению в ядро и активации транскрипции целевых генов [4]. Активность транскрипционного фактора STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) регулируется через окисление и восстановление остатков Cys (Cys328, Cys542, Cys259) с участием Prdx2 и тиоредоксина 1 (Trx1) [4]. По-видимому, подобная регуляторная функция может быть характерна для всех пероксиредоксинов [5, 6].

Среди пероксиредоксинов особый интерес вызывает Prdx6, который содержит один остаток цистеина в активном центре, а также обладает активностью фосфолипазы A2 (aiPLA2), что позволяет этому белку играть важнейшую роль в антиоксидантной защите и восстановлении клеточных мембран [9]. Животные, нокаутные по гену *PRDX6*, характеризуются ростом окислительных повреждений тканей и органов (в особенности почек, печени и лёгких), а также повышенной чувствительностью к окислительным повреждениям [10]. Напротив, трансгенные мыши с повышенной экспрессией *PRDX6* обладают более высокой резистентностью (по сравнению с нормальными животными) к окислительным повреждениям [11]. Однако гиперэкспрессия *PRDX6* способствует повышению уровня пролиферативной активности и онкотрансформации клеток. Кроме того, гиперпродукция Prdx6 коррелирует с ростом устойчивости раковых клеток к химиопрепаратам и ионизирующему излучению [6]. При этом пероксидазная активность Prdx6 стимулирует рост раковых клеток (обеспечивая устойчивость к окислительным факторам), а фосфолипазная активность aiPLA2 способствует их метастазированию. Нокдаун *PRDX6* в раковых клетках приводит к снижению скорости их роста и метастазирования [12].

В настоящее время молекулярные механизмы канцерогенного действия Prdx6 изучены недостаточно. Однако не вызывает сомнений, что онкогенный эффект Prdx6 не ограничен лишь его каталитическими свойствами, а также обусловлен его сигнально-регуляторной функцией [6]. Например, нокдаун *PRDX6* в клетках меланомы сопровождается снижением активности циклин-зависимой киназы CDK4/6, что приводит к подавлению роста и деления клеток [12]. Prdx6 связывается с DED (Death Effector Domain), доменом инициаторной каспазы-10, тем самым препятствуя формированию TRAIL-опосредованного сигнального комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex) и последующей активации эффекторных каспаз (3 и 7). Нокдаун *PRDX6* в клетках HeLa приводит к активации TRAIL-опосредованного апоптоза [13]. Нокдаун *PRDX6* в клетках HEK293T и HeLa вызывает активацию PTEN-индуцированной киназы 1 (PINK1), накопление маркера аутофагии p62, проникновение паркина внутрь митохондрий и запуск митофагии [14]. Показано, что онкогенная функция Prdx6 также осуществляется через взаимодействие с белком JAK2 и стимуляцию сигнального пути JAK2/STAT3, в результате чего значительно увеличивается уровень хемокина CCL5, стимулирующего деление клеток [15]. Таким образом, Prdx6 играет важную роль в физиологии клетки благодаря взаимодействию с ключевыми регуляторами апоптоза.

Как отмечалось ранее, транскрипционные факторы являются важнейшими объектами редокс-регуляции, т.к. под действием АФК изменяется их активность и специфичность, что оказывает влияние на экспрессию соответствующих генов, позволяя клетке адаптироваться в ответ на изменения её редокс-статуса [2]. Транскрипционный фактор p53 вовлечён в регуляцию множества клеточных процессов, включая рост, старение и апоптоз. Известно, что p53 является важнейшим онкосупрессором. Более половины из всех известных форм рака ассоциированы с различными мутациями в гене *TP53* (кодирующем белок p53), которые приводят к нарушению функции p53 и онкотрансформации клеток [16]. Способность p53 связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов-мишеней регулируется посттрансляционными модификациями, среди которых важное значение имеет редокс-регуляция, опосредованная окислением остатков цистеина [17]. Белок p53 имеет 10 остатков цистеина, расположенных в ДНК-связывающем домене (100–300

аминокислотные остатки), чувствительных к действию АФК. Три из них (Cys176, Cys238 и Cys242) связываются с атомом цинка (вместе с His179) и имеют решающее значение для правильного сворачивания и функционирования р53 [18]. Окисление вышеуказанных остатков цистеина подавляет способность р53 связываться с ДНК [19]. При этом окислительная модификация других цистеинов в ДНК-связывающем домене влияет на специфичность р53 и активацию соответствующих генов-мишеней [17]. Например, обратимое окисление Cys277 р53 способствует активации другого набора генов [17]. В современных представлениях о процессах редокс-регуляции р53 ещё много пробелов, это требует дальнейших исследований. Однако не вызывает сомнений, что регуляция этих процессов идёт с участием антиоксидантной системы клетки. Мы предположили, что Prdx6, будучи важнейшим ферментом-антиоксидантом, может играть важную роль в регуляции р53. В данной работе впервые показано, что при суперэкспрессии *PRDX6* наблюдается существенное подавление онкосупрессора р53, что может являться новым важным молекулярным механизмом канцерогенного действия пероксиредоксинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генно-инженерной конструкции. Ген пероксиредоксина 6 (*PRDX6*) мыши был получен с помощью ПЦР, в которой использовали высокоточную ДНК-полимеразу Tetsus («Евроген», Россия), ген-специфические олигонуклеотиды: прямой 5'-TGCCCTCGAGCCCGGAGGGTTGCTTCTCG-3' (XhoI), обратный 5'-CAAAGGTACCAGGCTGGGGTGTATAACGGAG-3' (KpnI) («Евроген») и кДНК мыши, полученную с помощью набора MMLV RT kit («Евроген») из тотальной РНК, выделенной с помощью реагента ExtractRNA («Евроген») из клеток эмбриональных фибробластов мыши 3Т3. Условия ПЦР и процедура клонирования была подробно описана нами ранее для изоформы *PRDX6* человека [20]. Полученный ген *PRDX6* мыши был клонирован по точкам XhoI и KpnI в эукариотический экспрессирующий вектор pTagGFP2-N («Евроген»), который кодирует химерный белок с зелёным флуоресцентным белком (GFP) на N-конце Prdx6. Точность генно-инженерной конструкции (pTagGFP2-N-PRDX6) подтверждали секвенированием.

Клеточная культура. Клетки эмбриональных фибробластов мыши Balb/c — 3Т3 (пре-

доставлены Лабораторией культур клеток и клеточной инженерии, ИБК РАН) высевали в культуральные флаконы (25 см²) с плотностью 1×10^6 клеток на флакон в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific», Великобритания) и смеси антибиотиков/антимикотиков («Sigma-Aldrich», США). Культивацию клеток проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для получения клеточной культуры с суперэкспрессией гена *PRDX6* проводили трансфекцию клеток 3Т3 (~10⁷ клеток) плазмидой pTagGFP2-N-PRDX6 с помощью реагента Lipofectamin 3000 («Thermo Fisher Scientific», США), следуя инструкции производителя. Трансфицированные клетки 3Т3 культивировали в присутствии генетицина (G-418, «Gibco», США), устойчивость к которому несёт плазида pTagGFP2-N-PRDX6. В дальнейших экспериментах использовали клетки 3–5 пассажа.

Облучение клеток. Клеточные культуры (нормальные и трансфицированные) подвергались воздействию рентгеновского излучения при комнатной температуре на терапевтическом рентгеновском аппарате РУТ-15 («Мосрентген», Россия) при мощности дозы 4 Гр/мин (фокусное расстояние 8,5 см, ток 20 мА, напряжение 200 кВ), полунлетальной дозой 16 Гр, которая была определена нами ранее для этой клеточной культуры [21].

Оценка жизнеспособности клеток. Клетки 3Т3 (нормальные и трансфицированные) в 96-луночных планшетах (из расчёта 1×10^4 клеток на лунку) подвергали облучению 16 Гр и затем культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. Монослой клеток трижды отмывали $1 \times$ PBS (1,7 мМ KH₂PO₄, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и затем окрашивали в течение 10 мин 0,05%-ным кристаллическим фиолетовым («Sigma-Aldrich», США), лунки тщательно промывали проточной дистиллированной водой, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1%-ного додецилсульфата натрия (Ds-Na). Поглощение измеряли через 10 мин при 546 нм на планшетном спектрофотометре Titertek Multiscan MCC/340 («Flow Laboratories», Финляндия) [22].

Экспрессия генов. Уровень экспрессии генов в клетках 3Т3 определяли с помощью ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из клеточных культур выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген») и обрабатывали термоинактивируемой ДНКазой I (RQ1, «Promega», США). Для обратной транскрипции использовали набор MMLV RT («Евроген»). Полученную кДНК

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансфекция эмбриональных фибробластов мыши 3Т3 плазмидой рTag-GFPN2-PRDX6 приводила к росту уровня мРНК гена *PRDX6* в 4–6 раз, а уровень белка Prdx6, в том числе в составе гибридной молекулы GFP-Prdx6, увеличивался в 3–4 раза (рис 1, *a* и *b*), т.е. наблюдался синтез как собственного Prdx6 клетки, так и в составе химерной молекулы. Химерный белок Prdx6-GFP был обнаружен во всех компартаментах клетки, в том числе в ядре клетки (рис 1, *b–e*), что коррелирует с известными данными для нормального Prdx6 [5, 6].

Пероксиредоксины являются важным элементом регуляции редокс-гомеостаза клетки [5], а изменения уровня этих ферментов (как снижение, так и повышение) оказывает значительное влияние на многие физиологические процессы клетки [28, 29]. Показано, что гиперпродукция Prdx1–6 приводит к повышению устойчивости клеток к окислительным факто-

рам, росту их пролиферативной активности и подавлению апоптоза [6, 30]. Наши исследования также показали, что гиперпродукция Prdx6 приводит к росту радиорезистентности трансфицированных клеток 3Т3 (рис. 2, *a*).

В нормальных условиях трансфицированные клетки 3Т3 (с суперэкспрессией *PRDX6*) по сравнению с обычными делились на ~25% чаще (рис. 2, *a*), что коррелировало с ростом уровня маркера пролиферации – *MKI67* в 2–3 раза (таблица). При действии рентгеновского излучения в дозе 16 Гр выживаемость трансфицированных клеток возрастала на 15–20% по сравнению с контрольными (рис. 2, *a*). Повышенная радиорезистентность клеток с суперэкспрессией *PRDX6*, по-видимому, связана с ростом их антиоксидантного статуса. Оценка пероксидазной активности клеточных лизатов клеток 3Т3 (нормальных и трансфицированных рTagGFP2-N-PRDX6) показала, что рост уровня эндогенного Prdx6 в 3–4 раза приводил к увеличению пероксидазной активности клеточного лизата на 20–50% (рис. 2, *b*).

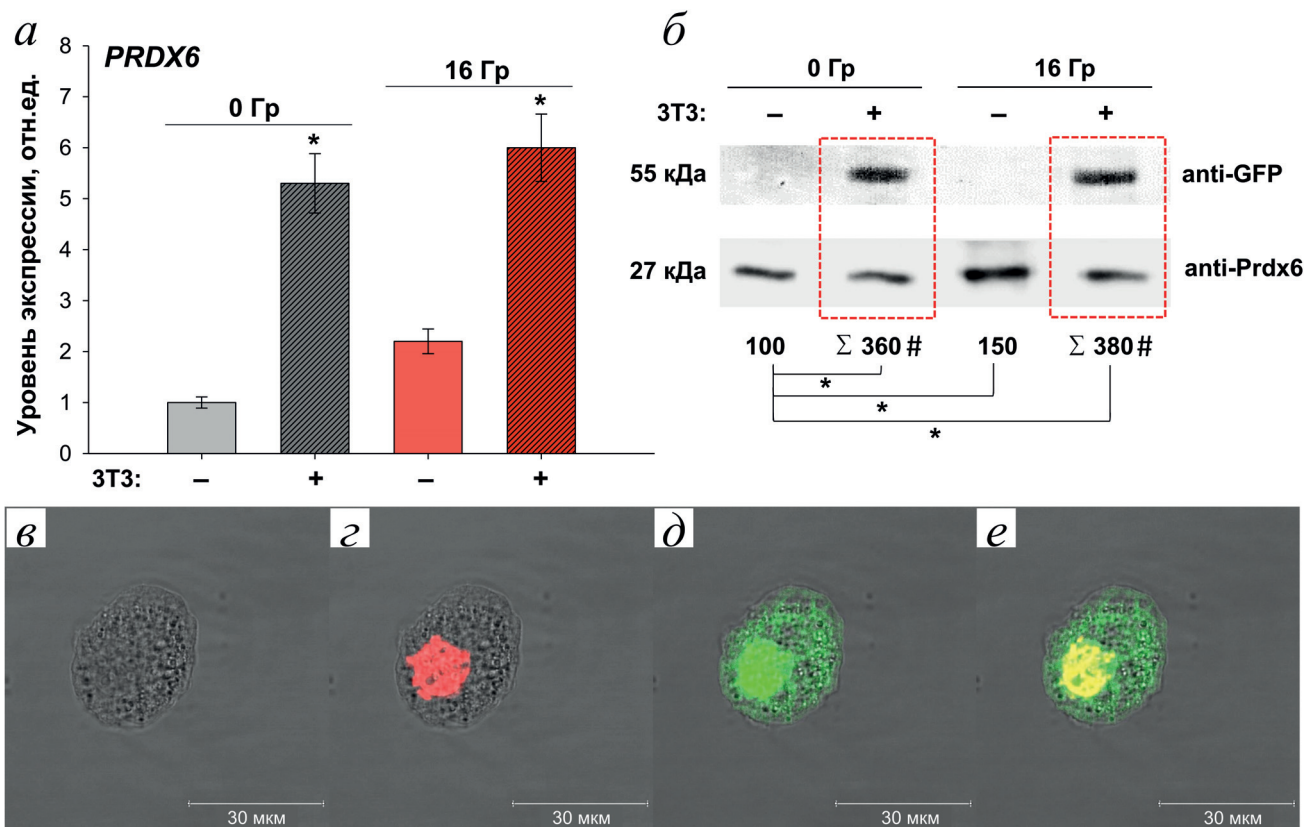


Рис. 1. Экспрессия *PRDX6* в обычных (–) и трансфицированных (+) клетках 3Т3. *a* – Уровень мРНК гена *PRDX6*. *б* – Уровень белка Prdx6. Химерный белок Prdx6-GFP молекулярной массой ~55 кДа идентифицируется антителами против GFP и поликлональными антителами к Prdx6. # Представлено суммарное значение уровня Prdx6 (эндогенного ~27 кДа, IgG anti-Prdx6) и в составе химерного белка Prdx6-GFP (~55 кДа, IgG anti-GFP). Изменения статистически значимы, * $p < 0,05$. Конфокальная микроскопия клеток 3Т3, трансфицированных плазмидой рTag-GFPN2-PRDX6: *в* – фазовый контраст; *г* – окраска этидий бромидом (канал TexasRed); *д* – флуоресценция химерного белка Prdx6-GFP (канал FAM); *е* – наложение каналов TexasRed и FAM

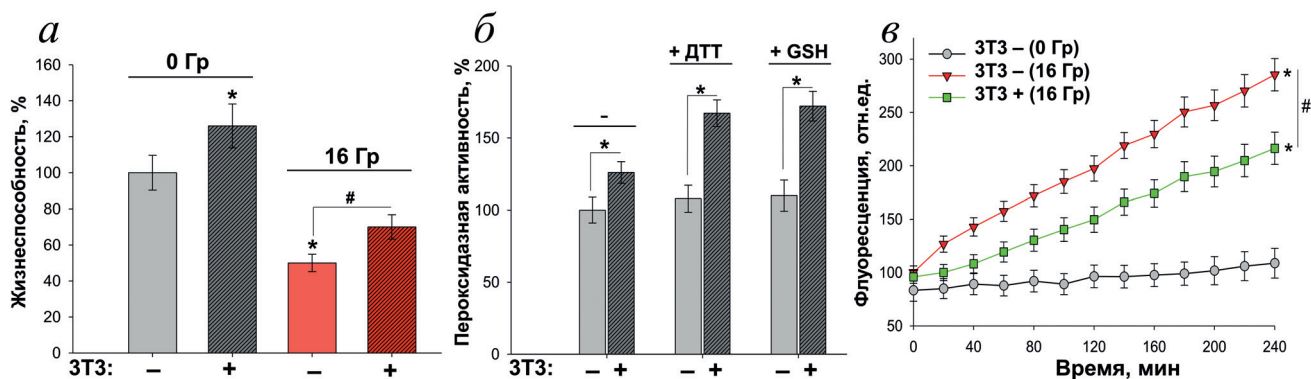


Рис. 2. Влияние суперэкспрессии *PRDX6* на физиологию клеток ЗТ3. *а* – Жизнеспособность обычных (–) и трансфицированных (+) клеток ЗТ3 в нормальных условиях (0 Гр) и при действии рентгеновского излучения (16 Гр). Значения статистически значимы ($p < 0,05$) относительно контроля 0 Гр (*) и клеток после облучения 16 Гр (#). *б* – Оценка пероксидазной активности лизатов исходных клеток ЗТ3 и трансфицированных плазмидой рTag-GFPN2-*PRDX6* при отсутствии и в присутствии восстановителей (ДТТ – дитиотреитол, GSH – глутатион); $n = 5$; * $p < 0,05$, # $p < 0,05$. *в* – Уровень внутриклеточных АФК в обычных и трансфицированных клетках ЗТ3, с повышенным уровнем Prdx6; $n = 3$; * $p < 0,01$, # $p < 0,05$

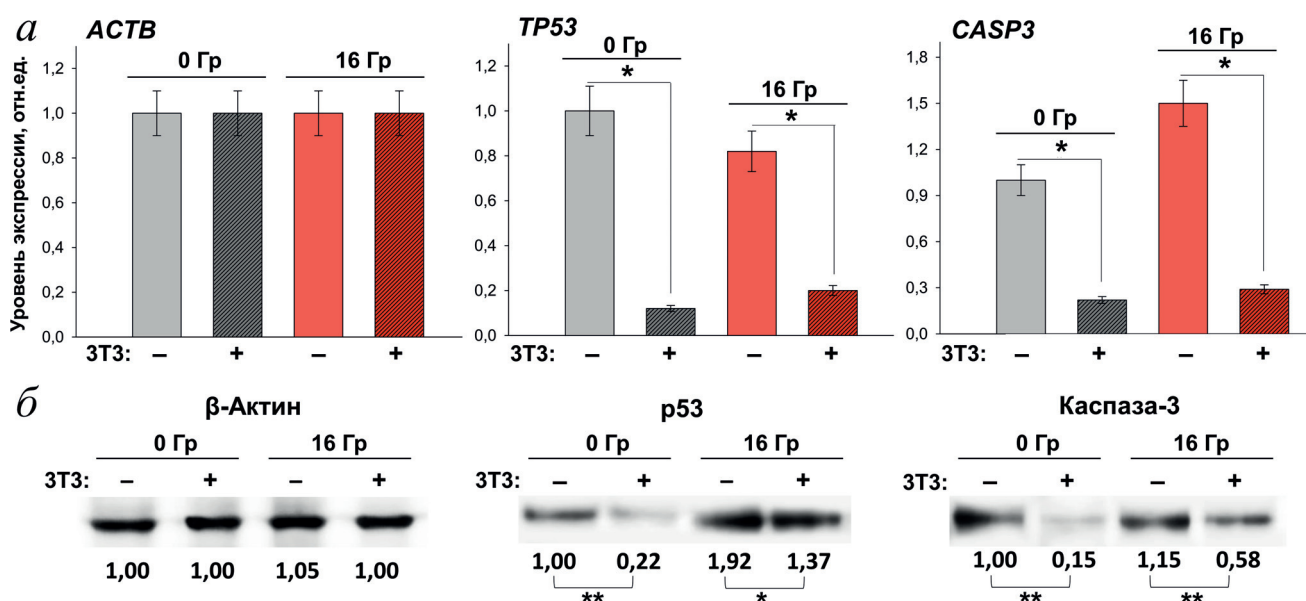


Рис. 3. Изменение уровня мРНК *TP53* и *CASP3* (*а*), белков p53 и каспазы-3 (*б*) в нормальных условиях (0 Гр) и спустя 3 ч после облучения (16 Гр) в обычных (–) и трансфицированных (+) клетках ЗТ3. Данные нормированы относительно мРНК (*АКТВ*) и белка цитоскелетного β-актина; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Кроме того, трансфицированные клетки спустя 4 ч после облучения дозой 16 Гр имели на 20–30% меньший уровень внутриклеточных АФК (рис. 2, *в*), а также сниженную индукцию некоторых генов (*NFE2L2*, *SOD1*, *PRDX1*) антиоксидантного ответа (таблица) по сравнению с обычными клетками ЗТ3.

Важно отметить, что суперэкспрессия *PRDX6* влияла не только на антиоксидантный статус клеток, но также и на сигнально-регуляторные процессы клетки. По-видимому, внутриядерная локализация Prdx6–GFP (рис. 1, *е*) позволяла ему не только участвовать в защите геномной ДНК (наряду с другими ферментами-антиоксидантами) от повреждающего

действия АФК, но и оказывать влияние на активность важнейших редокс-чувствительных транскрипционных факторов. Исследования показали, что рост уровня эндогенного Prdx6 приводил к существенному снижению уровня маркеров апоптоза: каспазы-3 (в 4–5 раз) и p53 (в 6–8 раз) (рис. 3). Известно, что снижение уровня p53 или его активности (вследствие мутаций) приводят к подавлению апоптоза и онкотрансформации клеток [31].

Известно, что основным механизмом активации p53 является повреждение геномной ДНК с последующей активацией комплекса MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) и ключевой редокс-чувствительной киназы АТМ (Ataxia

Изменение экспрессии некоторых маркерных генов в обычных и трансфецированных клетках 3Т3, спустя 3 и 6 ч после облучения

Функция	Гены	3Т3			3Т3 (pTagGFP-PRDX6)		
		0 Гр	16 Гр	16 Гр	0 Гр	16 Гр	16 Гр
	Доза/ Время	— —	3 ч	6 ч	— —	3 ч	6 ч
Воспаление, пролиферация, апоптоз	<i>HIF1A</i>	1	1,5	1,7	2,8*	2,0	3,5*
	<i>RELA</i>	1	0,8	12*	3,2*	2,4	15*
	<i>IL6</i>	1	0,9	5,4*	2,1	3,3	7,5*
	<i>MKI67</i>	1	0,3	0,6	2,5*	2,6*	3,2*
	<i>cJUN</i>	1	1,2	1,8	0,5*	0,9	1,5
	<i>TP53</i>	1	0,8	6,2*	0,1*#	0,2#	0,6#
	<i>CASP3</i>	1	1,5	10,7*	0,2*#	0,6#	3,5#
Антиоксидантный ответ	<i>NFE2L2</i>	1	0,7	6,5*	0,5	0,8	1,5#
	<i>SOD1</i>	1	4,9*	10,3*	1	2,4	4,5
	<i>SOD3</i>	1	5,5*	3,2	1	3,6	15,5*#
	<i>CAT</i>	1	2,5	2,2	0,8	2,7	2,5
	<i>PRDX1</i>	1	2,9*	10,9*	1,6	1,7	4,3*#
	<i>PRDX6</i>	1	4,6*	7,4*	5,3*	5,7*	6,5*
Репарация ДНК	<i>OGG1</i>	1	3,1*	30*	0,6	1,5	5,5*#
	<i>LIG4</i>	1	3,5*	18*	1	2	5,1*#
	<i>APEX1</i>	1	4,5*	8,7*	1	2,1	2,5#
	<i>XRCC4</i>	1	2,2	3,5*	1,3	1,7	2,6
	<i>XRCC5</i>	1	3,7*	7,8*	1,1	2,2	4,3#

Примечание. *HIF1A* – ген HIF-1 α ; *RELA* – ген, кодирующий р65-субъединицу NF- κ B; *IL6* – ген интерлейкина 6; *MKI67* – ген маркера пролиферации Ki-67; *cJUN* – ген, кодирующий Jun-субъединицу AP-1; *TP53* – ген, кодирующий белок р53; *CASP3* – ген эффекторной каспазы-3; *NFE2L2* – ген Nrf2; *SOD1* и *SOD3* – гены, кодирующие супероксид-дисмутазы 1 и 3 соответственно; *CAT* – ген каталазы; *PRDX1* и *PRDX6* – гены пероксиредоксина 1 и 6 соответственно; *OGG1* – ген, кодирующий 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазу; *LIG4* – ген ДНК-лигазы 4; *APEX1* – ген апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1; *XRCC4* и *XRCC5* – гены, кодирующие белки Ku70 и Ku80, участвующие в репарации двуцепочечных разрывов ДНК (X-ray repair cross complementing). Представлены средние значения ($SD \pm 10\%$) изменений экспрессии генов относительно уровня в обычных клетках 3Т3 при нормальных условиях; * $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно контроля 0 Гр; # $p < 0,05$ – изменения статистически значимы относительно нормальных клеток 3Т3 после облучения (16 Гр).

Telangiectasia Mutated) [32]. По всей видимости, избыток эндогенного Prdx6 в 3–4 раза способен понижать уровень АФК-опосредованных повреждений геномной ДНК. В частности, это проявлялось в снижении индукции генов репарации ДНК после облучения клеток, особенно это заметно спустя 6 ч после облучения (например, для гена *OGG1* показано уменьшение индукции почти в 6 раз), что сви-

детельствует о снижении уровня повреждения геномной ДНК в трансфецированных клетках (таблица). Обнаруженный ранее факт, что экспрессия гена *TP53* активируется с ростом АФК [18], также подтверждается полученными нами результатами. Обнаружено, что гиперпродукция Prdx6 снижала уровень внутриклеточных АФК на 30–40% (рис. 2, в), что коррелирует со снижением индукции р53 после

облучения (рис. 3, б) примерно на те же 30%. Следовательно, активная элиминация внутриклеточных пероксидов химерным белком Prdx6–GFP также может снижать индукцию экспрессии *TP53*.

Как упоминалось ранее, p53 подвержен посттрансляционной редокс-регуляции, в которой ферменты-антиоксиданты могут участвовать в качестве редокс-реле [4, 9, 19]. Ранее было показано, что транскрипционная активность p53 зависит от системы тиоредоксинов (TrxR1/Trx) – важнейших регуляторов редокс-гомеостаза [33], которые препятствуют окислению и S-глутатионилированию p53 (Cys124, Cys141 и Cys182), тем самым сохра-

няя его ДНК-связывающую способность [34]. По-видимому, пероксиредоксины аналогичным образом могут оказывать влияние на редокс-статус p53, непосредственно взаимодействуя с окисленной формой p53 по принципу редокс-реле (рис. 4, б). Ранее для олигомерной формы Prdx1 было показано прямое воздействие (по-видимому, в качестве шаперона) с p53 [35], а также киназами MST-1 и c-Abl, участвующих в регуляции активности p53. Учитывая консервативную трёхмерную структуру пероксиредоксинов [36], нельзя исключать подобного взаимодействия Prdx6 и p53, что может стать предметом дальнейших исследований. Кроме того, активация p53 может

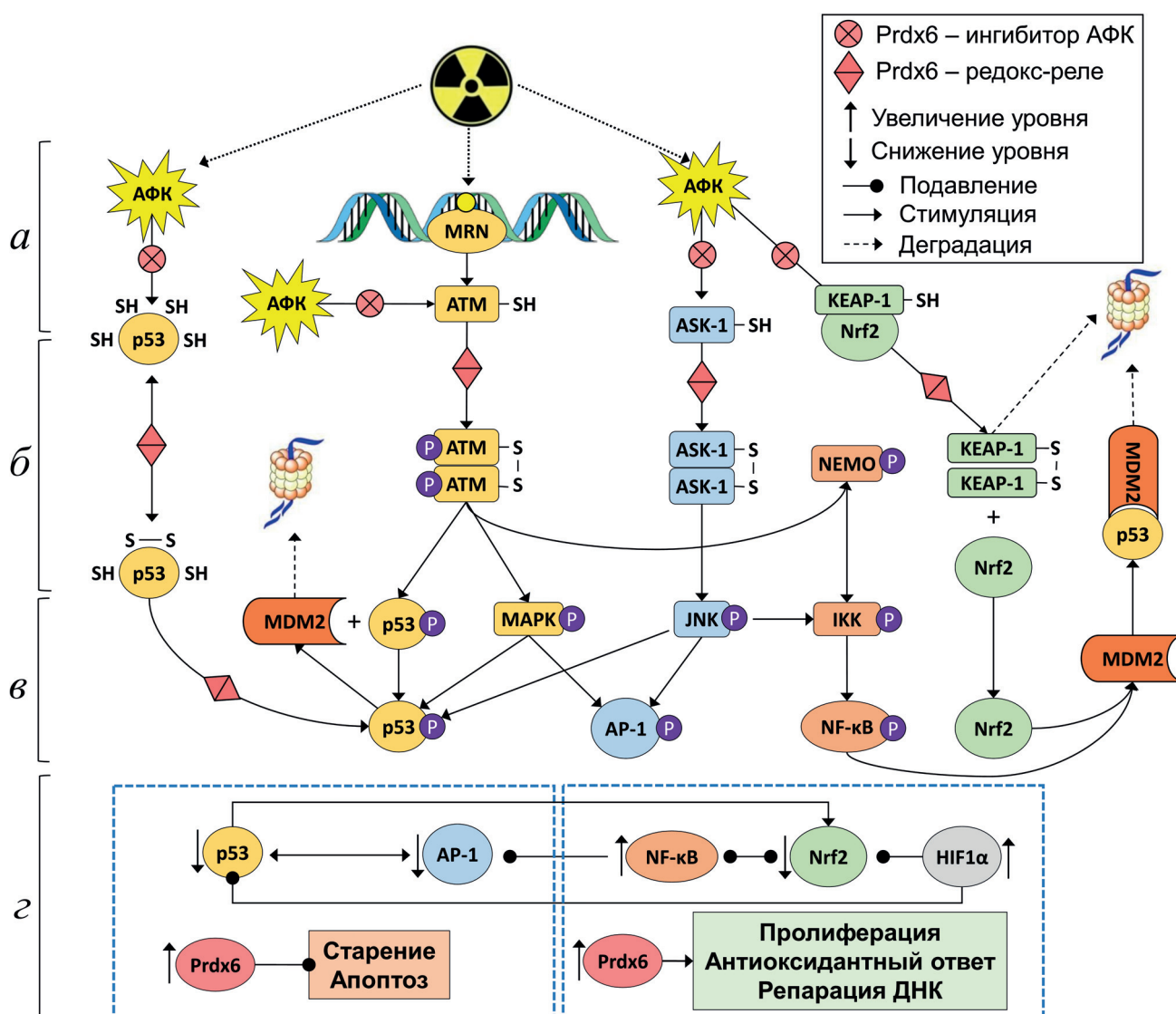


Рис. 4. Гипотетическая схема регуляции уровня p53 с участием эндогенного Prdx6 в условиях окислительного стресса, вызванного ионизирующим излучением. *а* – Влияние Prdx6 на уровень эндогенных АФК; *б* – регуляция редокс-статуса сигнально-регуляторных белков с участием Prdx6 (редокс-реле); *в* – многие киназы оказывают перекрёстное влияние на различные транскрипционные факторы; *г* – Prdx6 подавляет АФК-опосредованную активацию p53, AP-1 и Nrf2 и в то же время вызывает активацию NF-κB и HIF-1α, что в конечном счёте приводит к снижению уровня апоптоза и стимуляции клеточной пролиферации

происходить благодаря киназе JNK [37], функционирование которой, в свою очередь, могут контролировать пероксиредоксины через взаимодействие с вышележащей редокс-чувствительной киназой ASK-1 [38, 39] (рис. 4, б). Интересно, что в некоторых случаях рост уровня p53 приводит к усилению окислительного стресса из-за подавления экспрессии некоторых генов антиоксидантного ответа. Например, было показано, что p53 подавляет экспрессию MnSOD [40]. Таким образом, подавление p53 может вносить положительный вклад в антиоксидантную защиту клетки. При этом функционирование Prdx как редокс-реле может быть решающей в регуляции уровня p53 и его активности (рис. 4). По-видимому, рост пролиферативной активности и радиорезистентности клеток ЗТЗ с гиперпродукцией Prdx6 может быть обусловлен снижением уровня транскрипционного фактора p53 и подавлением апоптоза у трансфицированных клеток ЗТЗ после облучения (рис. 4).

Следует отметить, что уровень p53 регулируется не только АФК и различными киназами, но также и другими транскрипционными факторами.

Nrf2. Известно, что гиперпродукция Prdx6 способна подавлять в 2–4 раза экспрессию главного регулятора антиоксидантного ответа – транскрипционного фактора Nrf2 (*NFE2L2*) [41]. Этот факт подтвержден и в наших экспериментах как в нормальных условиях (0 Гр), так и после облучения (16 Гр), особенно заметно – спустя 6 ч после облучения (таблица). Известно, что транскрипционная активность Nrf2 в клетке контролируется с помощью АФК. В нормальных условиях одна молекула Nrf2 находится в комплексе с двумя молекулами ингибитора Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который подвергается убиквитинированию и быстрой деградации в протеасомах. С ростом уровня АФК остатки цистеинов молекул Keap1 окисляются, что приводит к диссоциации комплекса Keap1–Nrf2, транслокации Nrf2 в ядро клетки и последующей активацией целевых генов [42]. По-видимому, с ростом уровня Prdx6 падает концентрация внутриклеточных АФК, и активация Nrf2 существенно снижается (таблица). Кроме того, подавляющее действие на уровень Nrf2 оказывает рост NF-κB [43] и снижение уровня p53 [44].

NF-κB. С ростом количества Prdx6 в клетке наблюдается рост экспрессии NF-κB (*RELA*) в 2–3 раза (таблица). Увеличение уровня NF-κB под действием экзогенного Prdx6, которое обусловлено стимуляцией TLR4, было пока-

зано нами ранее [21]. Механизмы индукции NF-κB при увеличении эндогенного Prdx6 на сегодняшний день не ясны. Возможно, Prdx6 участвует в АФК-опосредованной стимуляции редокс-чувствительных киназ ATM и NEMO (NF-κB Essential Modulator) [45], которые активируют IκB-киназы (IKK). В свою очередь, IKK фосфорилируют ингибитор IκB [46], способствуя высвобождению NF-κB из комплекса с IκB и запуску транскрипции целевых генов (рис. 4, б). Рост уровня NF-κB оказывает подавляющее действие на p53 [47]. Негативный регулятор p53 – E3-убиквитинлигаза MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) является геном-мишенью как самого p53 (обеспечивая регуляцию по принципу отрицательной обратной связи), так и NF-κB. С ростом уровня NF-κB возрастает продукция MDM2, что способствует снижению p53 [48].

HIF-1. Гиперпродукция Prdx6 также приводит к росту (в 2–3 раза) экспрессии *HIF1A*. Транскрипционный фактор HIF-1, имеющий более 800 генов-мишеней, является важнейшим регулятором клеточных процессов в условиях гипоксии, окислительного стресса, а также он играет важную роль в канцерогенезе [49]. Недавно был показан АФК-опосредованный механизм регуляции транскрипционной активности HIF-1 через редокс-чувствительный белок Ref-1 (redox effector factor-1) [50]. По-видимому, аналогичным образом может действовать Prdx6. Интересно отметить, что HIF-1, наряду с Nrf2, NF-κB и C/EBPβ, участвует, в свою очередь, в регуляции экспрессии *PRDX6* [51]. При этом для некоторых изоформ пероксиредоксинов (*PRDX2*, *PRDX4*) показано влияние на транскрипционную активность HIF-1α по принципу отрицательной обратной связи [52]. Важно отметить, что HIF-1 подавляет p53 (через тирагиназу TYR-2), тем самым предотвращая апоптоз, вызванный ионизирующим излучением [53].

AP-1 участвует в регулировании процессов клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. AP-1 представляет из себя гомо- и гетеродимеры двух семейств белков: Jun (c-Jun, JunB, JunD) и Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB). Экспрессия Jun и Fos может индуцироваться различными факторами, в том числе АФК. Кроме того, АФК оказывают влияние на активность AP-1 через окисление остатков цистеина как в самих субъединицах Jun и Fos, так и в протеинкиназах (PTK, PKC, MAPK), которые активируются при окислении и модулируют функционирование AP-1 [54]. По-видимому, гиперпродукция Prdx6 снижает уровень внутриклеточных АФК, тем самым предотвра-

щает индукцию AP-1 (*cJUN*) (таблица) и его активацию вышестоящими киназами ASK-1 и JNK (рис. 4). Показано, что активность AP-1 регулируется белками редокс-реле: тиоредоксином 1 (Tx1) и редокс-эффекторным фактором (Ref-1) через реакции тиол-дисульфидного обмена [55]. По-видимому, аналогичным образом может действовать Prdx6. Интересно также отметить, что AP-1 в комплексе с NF-κB и Мус/Мах участвует в активации экспрессии *TP53* [56].

Таким образом, регуляция уровня p53 при суперэкспрессии *PRDX6* может происходить с участием различных сигнальных каскадов клетки. Несмотря на то что транскрипционные факторы p53, NF-κB, Nrf2, HIF-1 и AP-1 влияют на различные процессы клетки, они зачастую активируются одними и теми же стимулами. Во многих исследованиях было показано, что эти транскрипционные факторы могут как взаимно подавлять [2], так и активировать друг друга [57]. По-видимому, в зависимости от физиологического состояния клетки и уровня внутриклеточных АФК осуществляется регуляция внутриклеточной сигнализации, а определяющим фактором могут служить именно пероксиредоксины, функционирующие в сигнальных каскадах в качестве редокс-реле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что антиапоптотическое действие гиперпродукции Prdx6 может быть обусловлено подавлением онкосупрессора p53. Предложены молекулярные механизмы угнетения p53 при повышенном уровне Prdx6, которые требуют дальнейших детальных экспериментальных исследований. Влияние Prdx6 на уровень p53 может осуществляться на нескольких уровнях редокс-сигнализации, включая контроль концентрации гидропероксидов,

а также регуляцию окисления сигнальных киназ/фосфатаз и транскрипционных факторов по принципу редокс-реле. Несомненно, для сохранения нормальной физиологии клетки уровень эндогенных пероксиредоксинов должен находиться на оптимальном уровне, а экспрессия генов *PRDX1–6* строго контролироваться, обеспечивая соразмерный ответ на изменение концентрации АФК в клетке и внеклеточном пространстве [5]. Есть веские основания полагать, что дальнейшие исследования роли пероксиредоксинов в регуляции активности p53 смогут помочь в разработке новых эффективных методов терапии рака [6].

Вклад авторов. М.Г. Шарапов, О.В. Глушкова — концепция и руководство работой; М.Г. Шарапов, Р.Г. Гончаров, С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова — проведение экспериментов и обсуждение результатов; М.Г. Шарапов — написание текста статьи; О.В. Глушкова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00216А).

Благодарности. В работе использовали оборудование ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН: сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии (Leica TCS SP-5, «Leica», Германия), сектора источников ионизирующих излучений (РУТ-15, «Мосрентген», Россия). Часть работы выполнена с использованием планшетного ридера (Infinite 200, «Tecan», Австрия) ЦКП ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
2. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dybala-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
3. Dustin, C. M., Heppner, D. E., Lin, M. C. J., and Van Der Vliet, A. (2021) Redox regulation of tyrosine kinase signalling: more than meets the eye, *J. Biochem.*, **167**, 151-163, doi: 10.1093/JB/MVZ085.
4. Hopkins, B. L., and Neumann, C. A. (2019) Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response, *Redox Biol.*, **21**, 101104, doi: 10.1016/j.redox.2019.101104.
5. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, doi: 10.1134/s0006297921100084.
6. Sharapov, M. G., and Novoselov, V. I. (2019) Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogen-

- esis, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 79-100, doi: 10.1134/s0006297921100084.
7. Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A., and Dick, T. P. (2018) The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs, *Antioxid. Redox Signal.*, **28**, 558-573, doi: 10.1089/ars.2017.7162.
 8. Wadley, A. J., Aldred, S., and Coles, S. J. (2016) An unexplored role for peroxiredoxin in exercise-induced redox signalling? *Redox Biol.*, **8**, 51-58, doi: 10.1016/j.redox.2015.10.003.
 9. Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling, *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 68-83, doi: 10.1016/j.abb.2016.12.003.
 10. Wang, X., Phelan, S. A., Forsman-Semb, K., Taylor, E. F., Petros, C., et al. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179-25190, doi: 10.1074/jbc.M302706200.
 11. Phelan, S. A., Wang, X., Wallbrandt, P., Forsman-Semb, K., and Paigen, B. (2003) Overexpression of Prdx6 reduces H₂O₂ but does not prevent diet-induced atherosclerosis in the aortic root, *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 1110-1120, doi: 10.1016/S0891-5849(03)00462-3.
 12. Yun, H.-M., Park, K.-R., Lee, H. P., Lee, D. H., Jo, M., et al. (2014) PRDX6 promotes lung tumor progression via its GPx and iPLA2 activities, *Free Radic. Biol. Med.*, **69**, 367-376, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.001.
 13. Choi, H., Chang, J. W., and Jung, Y. K. (2011) Peroxiredoxin 6 interferes with TRAIL-induced death-inducing signaling complex formation by binding to death effector domain caspase, *Cell Death Differ.*, **18**, 405-414, doi: 10.1038/cdd.2010.113.
 14. Ma, S., Zhang, X., Zheng, L., Li, Z., Zhao, X., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 is a crucial factor in the initial step of mitochondrial clearance and is upstream of the PINK1-Parkin pathway, *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 486-501, doi: 10.1089/ars.2015.6336.
 15. Yun, H.-M., Park, K.-R., Park, M. H., Kim, D. H., Jo, M. R., et al. (2015) PRDX6 promotes tumor development via the JAK2/STAT3 pathway in a urethane-induced lung tumor model, *Free Radic. Biol. Med.*, **80**, 136-144, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.022.
 16. Zhu, G., Pan, C., Bei, J. X., Li, B., Liang, C., et al. (2020) Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies, *Front. Oncol.*, **10**, 1-9, doi: 10.3389/fonc.2020.595187.
 17. Shi, T., and Dansen, T. B. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxidants Redox Signal.*, **33**, 839-859, doi: 10.1089/ars.2020.8074.
 18. Eriksson, S. E., Ceder, S., Bykov, V. J. N., and Wiman, K. G. (2019) P53 as a hub in cellular redox regulation and therapeutic target in cancer, *J. Mol. Cell Biol.*, **11**, 330-341, doi: 10.1093/jmcb/mjz005.
 19. Butturini, E., Butera, G., Pacchiana, R., de Prati, A. C., Mariotto, S., et al. (2021) Redox sensitive cysteine residues as crucial regulators of wild-type and mutant p53 isoforms, *Cells*, **10**, 3149, doi: 10.3390/cells10113149.
 20. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., Fesenko, E. E., Bruskov, V. I., and Gudkov, S. V. (2017) The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals, *Free Radic. Res.*, **51**, 148-166, doi: 10.1080/10715762.2017.1289377.
 21. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., et al. (2021) The role of TLR4/NF-κB signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 22. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F β-cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 23. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 24. Sharapov, M. G., and Ravin, V. K. (2009) Peroxiredoxin 6 from the clawed frog *Xenopus laevis*: CDNA cloning, enzyme characterization, and gene expression during development, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 898-902, doi: 10.1134/S0006297909080112.
 25. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K., Dennery, P., Forman, H., et al. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 1-6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
 26. Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.*, **57**, e3357, doi: 10.3791/3357.
 27. Novoselova, E. G., Sharapov, M. G., Lunin, S. M., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., et al. (2021) Peroxiredoxin 6 applied after exposure attenuates damaging effects of X-ray radiation in 3T3 mouse fibroblasts, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1951, doi: 10.3390/antiox10121951.
 28. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., Lankin, V. Z., and Novoselov, V. I. (2021) Role of glutathione peroxidases and peroxiredoxins in free radical-induced pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1418-1433, doi: 10.1134/s0006297921110067.
 29. Lee, Y. J. (2020) Knockout mouse models for peroxiredoxins, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 182, doi: 10.3390/antiox9020182.
 30. Gao, L., Meng, J., Yue, C., Wu, X., Su, Q., et al. (2021) Integrative analysis the characterization of peroxiredoxins in pan-cancer, *Cancer Cell Int.*, **21**, 1-18, doi: 10.1186/s12935-021-02064-x.
 31. Hernández Borrero, L. J., and El-Deiry, W. S. (2021) Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1876**, 188556, doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188556.

32. Vaddavalli, P. L., and Schumacher, B. (2022) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging, *Trends Genet.*, **28**, 128-136, doi: 10.1016/j.tig.2011.12.002.
33. Pearson, G. D., and Merrill, G. F. (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5431-5434, doi: 10.1074/jbc.273.10.5431.
34. Velu, C. S., Niture, S. K., Doneanu, C. E., Pattabiraman, N., and Srivenugopal, K. S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-Binding domain during oxidative stress, *Biochemistry*, **46**, 7765-7780, doi: 10.1021/bi700425y.
35. Ding, C., Fan, X., and Wu, G. (2016) Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer, *J. Cell. Mol. Med.*, **21**, 193-202, doi: 10.1111/jcmm.12955.
36. Bolduc, J., Koruza, K., Luo, T., Malo Pueyo, J., Vo, T. N., et al. (2021) Peroxiredoxins wear many hats: Factors that fashion their peroxide sensing personalities, *Redox Biol.*, **42**, 101959, doi: 10.1016/j.redox.2021.101959.
37. Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., et al. (2014) ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 612-623, doi: 10.1038/cdd.2013.186.
38. Kim, S. Y., Kim, T. J., and Lee, K.-Y. Y. (2008) A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway, *FEBS Lett.*, **582**, 1913-1918, doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.015.
39. Jarvis, R. M., Hughes, S. M., and Ledgerwood, E. C. (2012) Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 1522-1530, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.001.
40. Dhar, S. K., Xu, Y., Chen, Y., and St. Clair, D. K. (2006) Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression, *J. Biol. Chem.*, **281**, 21698-21709, doi: 10.1074/jbc.M601083200.
41. Leonarduzzi, G., Sottero, B., and Poli, G. (2010) Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 336-374, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.
42. Wu, S., Lu, H., and Bai, Y. (2019) Nrf2 in cancers: a double-edged sword, *Cancer Med.*, **8**, 2252-2267, doi: 10.1002/cam4.2101.
43. Hellweg, C. E. (2015) The nuclear factor κ B pathway: A link to the immune system in the radiation response, *Cancer Lett.*, **368**, 275-289, doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.019.
44. Chen, W., Jiang, T., Wang, H., Tao, S., Lau, A., et al. (2012) Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death? *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1670-1675, doi: 10.1089/ars.2012.4674.
45. Miyamoto, S. (2011) Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage, *Cell Res.*, **21**, 116-130, doi: 10.1038/cr.2010.179.
46. Singh, V., Gupta, D., and Arora, R. (2015) NF- κ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures, *Discoveries*, **3**, e35, doi: 10.15190/d.2015.27.
47. Thomasova, D., Mulay, S. R., Bruns, H., and Anders, H. J. (2012) p53-independent roles of MDM2 in NF- κ B signaling: Implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases, *Neoplasia (United States)*, **14**, 1097-1101, doi: 10.1593/neo.121534.
48. Klein, A. M., De Queiroz, R. M., Venkatesh, D., and Prives, C. (2021) The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53, *Genes Dev.*, **35**, 575-601, doi: 10.1101/GAD.347872.120.
49. Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**, 207-214, doi: 10.1016/j.tips.2012.01.005.
50. Li, H. S., Zhou, Y. N., Li, L., Li, S. F., Long, D., et al. (2019) HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria, *Redox Biol.*, **25**, 101109, doi: 10.1016/j.redox.2019.101109.
51. Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Gudkov, S. V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
52. Luo, W., Chen, I., Chen, Y., Alkam, D., Wang, Y., et al. (2016) PRDX2 and PRDX4 are negative regulators of hypoxia-inducible factors under conditions of prolonged hypoxia, *Oncotarget*, **7**, 6379-6397, doi: 10.18632/oncotarget.7142.
53. Sendoel, A., Kohler, I., Fellmann, C., Lowe, S. W., and Hengartner, M. O. (2010) HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase, *Nature*, **465**, 577-583, doi: 10.1038/nature09141.
54. Wu, S., Gao, J., Ohlemeyer, C., Roos, D., Niessen, H., et al. (2005) Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1601-1610, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.006.
55. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997) Ap-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3633-3638, doi: 10.1073/pnas.94.8.3633.
56. Kirch, H.C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D., and Esche, H. (1999) Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF- κ B and Myc/Max, *Oncogene*, **18**, 2728-2738, doi: 10.1038/sj.onc.1202626.
57. Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Peng, B., et al. (2004) NF- κ B and AP-1 connection: Mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 Activity, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7806-7819, doi: 10.1128/mcb.24.17.7806-7819.2004.

EFFECT OF PEROXIREDOXIN 6 ON p53 TRANSCRIPTION FACTOR LEVEL

M. G. Sharapov*, R. G. Goncharov, S. B. Parfenyuk, and O. V. Glushkova

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: sharapov.mg@yandex.ru*

Peroxiredoxin 6 (Prdx6) is an important antioxidant enzyme with multiple functions in the cell. Prdx6 neutralizes a wide range of hydroperoxides, participates in phospholipid metabolism and cell membrane repair, and in the transmission of intracellular and intercellular signals. Disruption of normal Prdx6 expression in the cell leads to the development of pathological conditions. A decrease in Prdx6 concentration leads to an increase in oxidative damage to the cell. At the same time, hyperproduction of Prdx6 is associated with an increase in antioxidant status, suppression of apoptosis and carcinogenesis. Currently, the mechanisms of carcinogenic action of peroxiredoxins are not well understood. In this work we found that a 3-4-fold increase in Prdx6 production in mouse embryonic fibroblast 3T3 cells leads to a 4-5-fold decrease in the level of oncosuppressor p53. At the same time, hyperproduction of Prdx6 leads to increased expression of RELA and HIF1A, which have oncogenic effects. A 3-4-fold increase in intracellular Prdx6 increases the intensity of cell proliferation by 20-30%, promotes an increase in antioxidant activity by 30-50%, and increases the radioresistance of transfected 3T3 cells by 30-40%. The growth of intranuclear Prdx6 leads to a decrease in the expression of DNA repair genes in response to radiation, indicating a decrease in genomic DNA damage. This work discusses possible molecular mechanisms of p53 suppression during Prdx6 hyperproduction, which may find application in the development of new cancer therapy approaches.

Keywords: peroxiredoxin 6, p53, cell death, cell proliferation, oxidative stress, ionizing radiation

МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ АСТРОЦИТОВ

Обзор

© 2022 Я.В. Горина^{1,2*}, А.Б. Салмина^{1,2,3}, А.И. Ерофеев¹, Е.И. Герасимов¹,
А.В. Большакова¹, П.М. Балабан^{1,4}, И.Б. Безпрозванный^{1,5}, О.Л. Власова¹

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
лаборатория молекулярной нейродегенерации, 194021 Санкт-Петербург, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,
НИИ молекулярной медицины и патобиохимии,
660022 Красноярск, Россия; электронная почта: yapa_20@bk.ru

³ Научный центр неврологии, Институт мозга, лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии,
105064 Москва, Россия

⁴ Институт высшей нервной деятельности, лаборатория клеточной нейробиологии обучения,
117485 Москва, Россия

⁵ Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, отделение физиологии,
75390 Даллас, США

Поступила в редакцию 18.05.2022

После доработки 27.06.2022

Принята к публикации 28.06.2022

Астроциты являются наиболее распространенным типом глиальных клеток, которые обеспечивают гомеостаз и защиту центральной нервной системы. Важной специфической характеристикой астроцитов является проявление морфологической неоднородности, находящейся в прямой зависимости от локализации в той или иной области мозга. Астроциты могут интегрироваться в нейронные сети и поддерживать активность нейронов в различных областях мозга. Более того, астроциты экспрессируют множество рецепторов, каналов и мембранных переносчиков, что лежит в основе их своеобразной метаболической активности, которая определяет пластичность центральной нервной системы в процессе развития и старения. Столь сложная структурно-функциональная организация астроцитов обуславливает использование современных методов их идентификации и анализа. Учитывая то важное обстоятельство, что определение наиболее подходящего маркера для полиморфных и множественных подгрупп астроцитов имеет решающее значение для исследования их многофункциональности, в этом обзоре представлены маркеры, современные методы визуализации и идентификации астроцитов, которые представляют собой ценный ресурс для изучения структурных и функциональных свойств астроцитов, а также лучшего понимания степени вклада астроцитов в нейрональную активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, маркеры, методы визуализации, микроРНК, оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972522070119, **EDN:** AWCKOQ

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты долгое время считались вспомогательными клетками, которые обеспечи-

вают только трофическую, метаболическую и структурную поддержку нейронов [1]. Однако за последние три десятилетия обширные исследования показали, что они играют

Принятые сокращения: AQP4 – аквапорин 4; CaM – кальмодулин; CB1 – каннабиноидные рецепторы типа 1; ChR2 – каналный родопсин 2; Cx – коннексин; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; FACS – флуоресцентно-активированная сортировка клеток; GFP – зеленый флуоресцентный белок; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; GPCR – рецепторы, связанные с G-белком; GPR56 – рецептор 56, связанный с G-белком; GS – глутаминсинтаза; LCN2 – липокалин-2; Mfge8 – фактор роста эпидермальных клеток-8 из жировых глобул молока; NDRG2 – ген 2, регулируемый нижестоящим N-мус; NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата; TRP – канал потенциальных переходных рецепторов.

* Адресат для корреспонденции.

решающую роль в физиологических и патологических функциях мозга. Так, астроциты регулируют ионный гомеостаз, контролируют церебральный кровоток, способствуют образованию новых кровеносных сосудов, защищают нейроны от эксайтотоксического повреждения и гибели, способствуют образованию синапсов, участвуют в энергетическом метаболизме головного мозга и формировании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [2].

Более этого, вместе с пре- и постсинаптической мембранами астроциты образуют так называемый трехчастный синапс, тем самым обеспечивая эффективную синаптическую передачу [3]. При этом астроциты секретируют глиотрансмиттеры, цитокины, метаболиты, которые участвуют в нейрон-астроглиальном сопряжении и глиоваскулярном контроле [4].

Интересно и то, что астроциты обладают способностью модулировать фенотип микроглии и фагоцитоз за счет перекрестного взаимодействия астроцитов и микроглии. Это подразумевает высвобождение различных сигнальных молекул как микроглией, так и астроцитами, что позволяет устанавливать аутокринную обратную связь для направленной реципрокной модуляции при повреждении центральной нервной системы (ЦНС) [5].

В целом, астроциты являются критически важными участниками в развитии и функционировании головного мозга [6]. Активность астроцитов кодируется динамическими внутри- и межклеточными сигналами, которые регулируют синаптическую пластичность, взаимодействие в нейронных цепях, а также способствуют консолидации памяти [7]. Внутриклеточные колебания уровня свободного Ca^{2+} , представляющие собой важный аспект активности астроцитов, могут происходить спонтанно или в результате активации нейротрансмиттерами NMDAR (рецептор N-метил-D-аспартата, N-methyl-D-aspartate receptors) и TRP (канал потенциальных переходных рецепторов, Transient receptor potential), а также рецепторов, связанных с G-белком (GPCR, G-protein-coupled receptors) [8]. Такая передача сигналов астроцитами посредством повышения цитозольного Ca^{2+} обеспечивает высвобождение глиотрансмиттеров, нейроваскулярное взаимодействие и пресинаптическое структурное ремоделирование [9]. Недавно полученные данные [10] демонстрируют, что астроглиальные каннабиноидные рецепторы типа 1 (CB1, type-1-cannabinoid) определяют доступность D-серина (агонист синаптических NMDAR) в синапсах гиппокампа. Это демонстрирует,

что астроглиальные рецепторы CB1 являются ключевыми детерминантами физиологической консолидации памяти распознавания новых объектов в гиппокампе. Так, делеция гена *CB1* приводит к нарушению связывания D-серина с синаптическими NMDAR в гиппокампе GFAP-*CB1*-нокаутных мышей, что сопряжено с нарушением памяти распознавания объектов, а также снижением долговременной потенциации в синапсах гиппокампа. Это подразумевает существование нового механизма астроглиальной регуляции синаптической пластичности посредством D-серин-зависимой регуляции NMDAR [10].

Необходимо также отметить, что особенностью астроцитов является их неоднородность с точки зрения экспрессии генов, морфологии и функционального взаимодействия с локальными нейронными сетями [11]. Взаимодействие астроцитов с нейронами необходимо для реализации таких процессов, как формирование и функционирование синапсов, высвобождение и повторный захват нейромедиаторов, синтез нейротрофических факторов и контроль выживания нейронов. При этом важно отметить, что функциональная связь, существующая между астроцитами и нейронами, в значительной степени сохраняется как во взрослом, так и стареющем головном мозге здоровых животных, но подвергается существенным изменениям при развитии нейродегенеративных заболеваний [12].

Визуализация и идентификация астроцитов, особенно в препаратах *in situ* и в головном мозге *in vivo*, является, безусловно, нетривиальной задачей. Трудности заключаются в значительной морфологической гетерогенности и в отсутствии универсального маркера, который может маркировать все клетки астроглиальной природы. Существующие методы включают классическое гистологическое окрашивание и иммуноцитохимию (выполняемую на фиксированных тканях), генетически контролируемую экспрессию специфических для астроцитов флуоресцентных маркеров, инкубацию с флуоресцентными зондами, а также внутриглиальную инъекцию флуоресцентных красителей.

В этой статье мы рассматриваем маркеры и современные методы визуализации и идентификации астроцитов, характеризующихся полиморфизмом и многофункциональностью, что даст возможность расширить понимание степени вклада астроцитов в нейрональную активность, модуляцию синаптической передачи и пластичности, а также двунаправленную коммуникацию между астроцитами и нейронами.

РАЗНООБРАЗИЕ МАРКЕРОВ АСТРОЦИТОВ

До настоящего времени не существует универсального маркера, который может окрашивать и идентифицировать все астроциты в ЦНС, что обусловлено специфической морфологической гетерогенностью астроцитов, которая, в свою очередь, сопряжена со значительным разнообразием экспрессии различных молекул [13] (таблица).

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Одним из наиболее популярных маркеров астроцитов является глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – основной белок промежуточных филаментов в зрелых

астроцитах, а также важный компонент цитоскелета астроцитов в период развития [14]. Важно подчеркнуть, что GFAP, как особенно широко используемый астроцитарный маркер, преимущественно экспрессируется в астроцитах белого, а не серого вещества [44]. Более того, GFAP не может маркировать все отростки астроцитов, поскольку до 85% астроцитарных отростков его не содержат [45].

Примечательно, что в патофизиологических условиях повышенная экспрессия GFAP является чувствительным и надежным маркером реактивных астроцитов, тогда как в здоровой ткани многие астроциты не экспрессируют GFAP в количествах, обнаруживаемых

Маркеры астроцитов

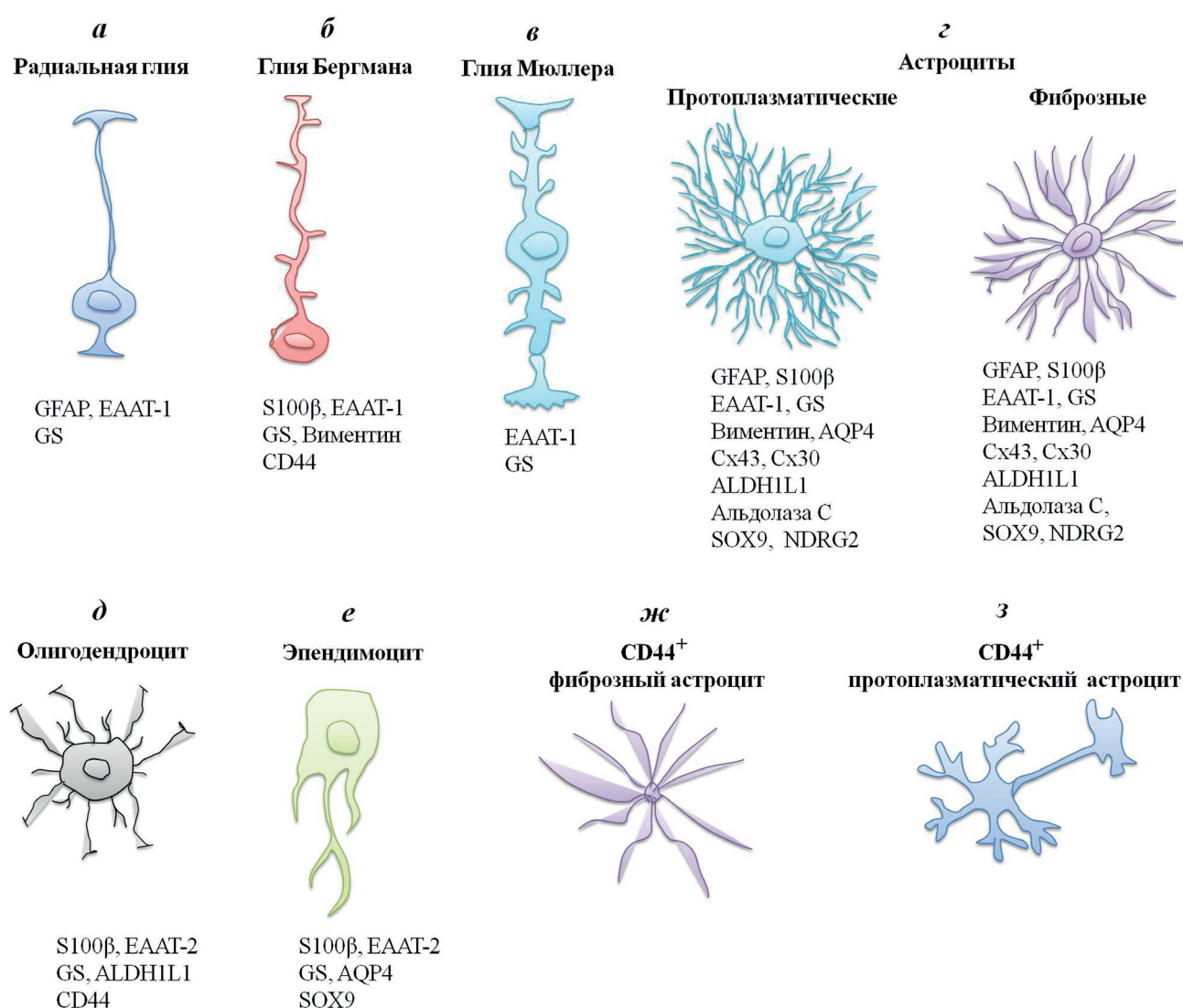
Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	белок промежуточных филаментов; обеспечивает структурную стабильность клеток; регулирует морфологию и функции астроцитов	зрелые астроциты, радиальная глия, нейральные стволовые клетки	кора, гиппокамп, миндалинное тело, гипоталамус, обонятельная луковица, мозжечок	высокий уровень экспрессии после рождения, который снижается по мере старения организма	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[14–16]
S100β	поддержание гомеостаза Ca ²⁺ ; регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток; участвует в ремоделировании промежуточных филаментов астроцитов; биомаркер апоптоза	астроциты, глия Бергмана, олигодендроциты, эпендимциты, эпителий сосудистого сплетения, эндотелиальные клетки сосудов, лимфоциты, нейроны	кора, гиппокамп, гипоталамус, миндалинное тело, мозжечок	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[17–19]
Транспортеры глутамата: EAAT-1 (GLAST), EAAT-2 (GLT-1)	астроглиальные специфические переносчики глутамата; участвуют в клиренсе глутамата	EAAT-1 – радиальная глия, фиброзные и протоплазматические астроциты, глия Бергмана, глия Мюллера сетчатки; EAAT-2 – нейроны, глиальные клетки (олигодендроциты, эпендимные клетки, эпителиальные клетки хориоидного сплетения, сателлитные клетки и шванновские клетки)	EAAT-1 – мозжечок; EAAT-2 – гиппокамп, боковая перегородка, кора головного мозга, полосатое тело	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	низкий уровень экспрессии	[20, 21]
Глутаминсинтетаза (GS)	участвует в реакции образования глутамина из аммиака и глутамата	радиальная глия, глия Бергмана, глия Мюллера сетчатки, астроциты, эпендимные клетки, олигодендроциты, нейроны	повсеместно присутствует в головном мозге	высокая активность, которая снижается по мере старения организма	активность снижается	[22, 23]

Таблица (продолжение)

Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
Виментин	промежуточный протеин филаментов, участвующий в регуляции клеточной дифференцировки, адгезии, миграции, передаче клеточных сигналов, в клеточном стрессовом ответе в дифференцирующихся клетках	астроциты, глия Бергмана, взрослые нервные стволовые клетки	кора головного мозга, мозжечок, гиппокамп	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в гипертрофированных астроцитах, реактивной микроглии, макрофагах	[24–26]
Акваторин 4 (AQP4)	белок, представитель семейства аквапоринов, образующих водопроводящие каналы в клеточных мембранах; контролирует гомеостаз воды и ионов; участвует в миграции астроцитов, проведении нервных сигналов	астроциты, эпендимциты	гетерогенно экспрессируется по всей ЦНС; в наибольшей степени — в мозжечке; наименее выражено — в гиппокампе и коре головного мозга	уровень экспрессии увеличивается в процессе онтогенеза	низкий уровень экспрессии	[27, 28]
Коннексины: Cx43, Cx30	организуют астроцитарные сети, которые координируют деятельность локальных нейронных сетей, транспортируя глутамат или глутамин; осуществляют трофическую функцию для нейронов, опосредуя доставку глюкозы и молочной кислоты	Cx30 избирательно экспрессируется в астроцитах серого вещества, Cx43 и Cx30 совместно экспрессируются в щелевых контактах астроцитов	кора, гипоталамус, таламус и гиппокамп	высокая активность Cx43 как после рождения, так и по мере старения организма; активность Cx30 увеличивается в течение первых 3 недель после рождения и достигает максимума через 4 недели	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[7, 29, 30]
ALDH1L1	участвует в метаболизме фолиевой кислоты	астроциты, олигодендроциты	широко экспрессируется по всему головному мозгу	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[31–33]
Альдолаза С	фермент, участвующий в гликолизе в астроцитах с образованием лактата, который является источником энергии для нейронов	астроциты, нейроны мозжечка (клетки Пуркинье)	мозжечок, кора	высокий уровень экспрессии после рождения, который сохраняется в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в клетках Пуркинье	[34–36]
SOX9	фактор транскрипции, играющий важную роль в транскрипции зрелых астроцитов и регуляции их функций	астроциты, нейрональные клетки-предшественники, эпендимные клетки	гиппокамп, обонятельная луковица, мозжечок	уровень экспрессии не снижается по мере старения организма	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[37, 38]

Таблица (окончание)

Маркер	Функциональная роль белка	Экспрессия в клетке	Экспрессия в регионе мозга	Изменения в онтогенезе	Изменения при патологии	Ссылки
CD44	трансмембранный гликопротеин, участвующий в адгезии между клетками и матриксом и в опосредованной матриксом передаче сигналов	астроциты, олигодендроциты, нервные стволовые клетки, глия Бергмана, нейроны Пуркиньи	гиппокамп, кора, мозжечок	уровень экспрессии снижается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[39–41]
NDRG2	опухолевый супрессор и ген, связанный с клеточным стрессом, пролиферацией и дифференцировкой клеток	зрелые астроциты	кора, обонятельная луковица, гиппокамп, средний мозг и таламус	уровень экспрессии повышается в процессе онтогенеза	высокий уровень экспрессии в реактивных астроцитах	[42, 43]



Типы глиальных клеток и маркеры для их визуализации. *а* – Радialная глия – экспрессия GFAP [77], EAAT-1 [78], GS [77]; *б* – Глия Бергмана – экспрессия S100β [79], EAAT-1 [80], GS [81], Виментин [82], CD44 [41]; *в* – глия Мюллера – экспрессия EAAT-1 [83], GS [84]; *г* – Астроциты – экспрессия GFAP, S100β, EAAT-1, виментин, AQP4, ALDH1L1 [85], GS [86], Cx43 [87], Cx30 [88], Альдолаза С [89], SOX9 [37], NDRG2 [90]; *д* – Олигодендроциты – экспрессия S100β [56], EAAT-2 [91], GS [92], ALDH1L1 [93], CD44 [94]; *е* – Эпендимоцит – экспрессия S100β [95], EAAT-2 [96], GS [77], AQP4 [97], SOX9 [98]; *ж* – CD44⁺ фиброзный астроцит [75]; *з* – CD44⁺ протоплазматический астроцит [75]

иммуногистохимическим методом, что, в свою очередь, указывает на то, что отсутствие детектируемого GFAP не позволяет сделать заключение об отсутствии астроцитов [16].

Интересен и тот факт, что астроциты в разных областях головного мозга могут демонстрировать выраженные различия в уровне экспрессии GFAP, а именно: в гиппокампе выявлен высокий уровень экспрессии данного маркера, тогда как в таламусе этого не наблюдалось [14, 15].

Известно, что в здоровом мозге человека GFAP в основном экспрессируется в зрелых астроцитах [14]. Однако, согласно экспериментальным данным, экспрессия GFAP наблюдалась в радиальной глии развивающегося человеческого мозга и в нейрональных стволовых клетках взрослого мозга [15, 46], тем самым указывая на то, что GFAP экспрессируется также в незрелых недифференцированных клетках ЦНС (рисунок).

Интересным является и то, что в ходе одного из исследований [47], целью которого было изучение клеток соматосенсорной коры и CA1 области гиппокампа мышей путем одноклеточного секвенирования РНК (scRNA-Seq), обнаружено 47 различных подклассов, включающих все известные основные типы клеток коры головного мозга. При этом астроциты принадлежали только к 2 подклассам, в один из которых входили астроциты, экспрессирующие GFAP, а в другой – астроциты, экспрессирующие фактор роста эпидермальных клеток-8 из жировых глобул молока (Mfge8, milk fat globule-EGF-factor 8), что вновь указывает на ограниченное присутствие GFAP в значительной популяции астроглиальных клеток. Кроме того, важно учитывать тот факт, что GFAP экспрессируется клетками радиальной глии (по сути, стволовыми клетками ЦНС), поэтому идентификация этого маркера в участках нейрогенеза не соответствует локализации зрелых астроцитов, что делает необходимым применение протоколов с использованием альтернативных маркеров.

S100β. Гликопротеин S100β представляет собой Ca²⁺-связывающий белок, который регулирует пролиферацию клеток и их дифференцировку [48]. В астроцитах, полученных от S100β-нокаутных мышей, наблюдается выраженное нарушение передачи сигналов Ca²⁺, что указывает на важную роль S100β в поддержании гомеостаза Ca²⁺ в астроцитах [49].

Примечателен и тот факт, что S100β может участвовать в ремоделировании промежуточных филаментов астроцитов путем предотвращения избыточной полимеризации GFAP

в присутствии микромолярных уровней Ca²⁺, что, в свою очередь, подтверждает идею о том, что промежуточные филаменты астроглиальных клеток представляют собой динамические структуры цитоскелета, а также о существовании цитоплазматических факторов, участвующих в регуляции процесса их сборки [50].

Известно, что астроциты синтезируют и экспрессируют S100β, который в зависимости от уровня экспрессии оказывает нейропротекторный или нейротоксический эффект, стимулирует пролиферацию астроглии, способствует ее реактивности в более высоких концентрациях, а также регулирует активацию микроглии в участках воспаления [51]. Более того, согласно экспериментальным данным, S100β является глиальным модулятором нейрональной синаптической пластичности и долговременной потенциации [52].

При патологических состояниях экспрессия S100β существенно изменяется, поэтому, например, повышенные уровни этого белка в сыворотке и спинномозговой жидкости могут иметь определенное диагностическое значение в контексте повреждения клеток астроглиальной природы [53].

Использование S100β в качестве маркера астроцитов обусловлено его высоким уровнем экспрессии, особенно в периваскулярной астроглии. Так, двойное иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием S100β и GFAP показало, что только около 80% S100β-положительных клеток также были и GFAP-положительными, в то время как все GFAP-положительные клетки также экспрессировали и S100β в гиппокампе мышей. При этом уровень экспрессии S100β у астроцитов был значимо больше, чем GFAP. Более того, GFAP-положительные клетки, экспрессирующие S100β, практически не отличались от GFAP-отрицательных по размеру, форме и иммунореактивности к S100β [54] (рисунок).

Более того, в ходе сравнительного анализа распределения и экспрессии трех маркеров астроцитов – NDRG2, GFAP и S100β – в коре, гиппокампе и таламусе установлено, что в отличие от GFAP-иммунопозитивных астроцитов, NDRG2- и S100β-экспрессирующие астроциты распределены более равномерно по всему головному мозгу. При этом высокий уровень экспрессии NDRG2 и S100β наблюдался в коре и таламусе, а GFAP – в гиппокампе [55].

В дополнение к этому S100β экспрессируется в астроцитах серого и белого вещества [56], тогда как GFAP – только в белом веществе головного мозга [57]. Однако клеточная специфичность S100β существенно усту-

пает таковой у GFAP. Так, помимо экспрессии S100 β в астроцитах, выявлено его присутствие в олигодендроцитах [17], эпендимоцитах [18], эндотелии кровеносных сосудов, лимфоцитах [19], а также в нейронах [58] (рисунок).

S100a10 — член семейства белков S100, который экспрессируется во многих органах (сердце, почки, печень, легкие, селезенка, желудочно-кишечный тракт), в том числе и в головном мозге, где он играет важное значение в транспортировке через мембраны, секреции везикул и эндоцитозе [59]. В отличие от S100 β , экспрессия S100a10 была выявлена не только в нейронах, эндотелиальных клетках стенок кровеносных сосудов, астроцитах, микроглии, олигодендроцитах, эпендимных клетках в различных областях головного мозга, но и в перicyтах [60]. При этом экспрессия S100a10 в нейронах даже в пределах одной области головного мозга менее выражена, тогда как астроциты и микроглия отличаются высоким уровнем экспрессии. Кроме того, экспрессия S100a10 выражено усиливается в реактивных астроцитах при повреждении головного мозга у мышей с моделью инсульта и нейровоспаления [61].

EAAT-1 и EAAT-2. Установлено, что транспортеры глутамата EAAT-1 (GLAST) [21] и EAAT-2 (GLT-1) [21] экспрессируются практически исключительно в астроцитах. При этом EAAT-1 является наиболее распространенным маркером, что обусловлено его достаточно широкой локализацией в глии Бергмана, глии Мюллера, радиальной глии [62] (рисунок). В другом исследовании установлено, что GLT-1 в высоких концентрациях экспрессируется в гиппокампе, боковой перегородке, коре головного мозга и полосатом теле, в то время как GLAST преимущественно экспрессируется в мозжечке [21].

Необходимо отметить и тот факт, что EAAT-1 (GLAST) и EAAT-2 (GLT-1) не обладают высокой специфичностью. Так, в результате альтернативного сплайсинга был получен синтетический пептид GLT-1, который преимущественно экспрессировался в нейронах ЦНС и периферической нервной системе (ПНС), а также обнаруживался в глиальных клетках (олигодендроцитах, эпендимных клетках, эпителиальных клетках хориоидного сплетения, сателлитных клетках и шванновских клетках) (рисунок). Более того, при иммуноокрашивании с использованием антитела против синтетического пептида GLT-1 выявлено преимущественно цитоплазматическое окрашивание нейронов и глиальных клеток, что позволяет предположить присутствие GLT-1 в мембранах внутриклеточных везикул [20].

Глутаминсинтетаза (GS). В последнее время в качестве еще одного маркера астроцитов рассматривают глутаминсинтетазу (GS), экспрессия которой зафиксирована во многих регионах головного мозга. При этом GS маркирует различные типы астроцитов, включая радиальную глию, глию Мюллера и глию Бергмана [22] (рисунок). Примечательно, что в результате двойного иммунофлуоресцентного окрашивания гиппокампа крыс GFAP-положительные астроглиальные клетки экспрессировали GS, тем самым составляя GS-положительную субпопуляцию астроцитов, однако в последней около 40% могли нести GFAP-отрицательные клетки [63]. В дополнение к этому, в другом исследовании двойное иммунофлуоресцентное окрашивание энторинальной коры мышей выявило, что 10% клеток совместно экспрессировали GS и GFAP, только GFAP-положительные клетки составляли 12%, тогда как 78% глиальных клеток экспрессировали исключительно GS [64].

GS имеет цитоплазматическую локализацию в астроцитах [65]. Кроме того, в исследовании *in vitro* показано, что GS в астроцитах может быть локализована в мембране везикул [22].

Однако стоит отметить и то, что экспрессия GS наблюдается как в астроцитах, так и в олигодендроцитах, эпендимных клетках и в некоторых нейронах головного мозга человека [23] (рисунок).

Виментин. Виментин является представителем семейства промежуточных филаментов, который принимает участие в регуляции дифференцировки и миграции клеток, а также передаче клеточных сигналов [25]. Виментин экспрессируется в астроцитах (рисунок), при этом в процессе развития уровень его экспрессии постепенно снижается [66].

Установлено, что у мышей, нокаутных по GFAP и гену, кодирующему виментин, наблюдались нарушения в образовании глиальных рубцов в ответ на повреждение ЦНС, а также изменения реактивности церебральных кровеносных сосудов [67]. Последнее может быть вызвано патологическим изменением свойств эндотелиальных или периваскулярных клеток (как следствие отсутствия виментина в данных клетках) [68] и снижением способности окружающей ткани выдерживать расширение кровеносных сосудов (как следствие отсутствия GFAP и виментина в астроглиальных клетках). В целом, это демонстрирует возможное участие виментина в активации астроцитов в результате развития нарушений в ЦНС.

Аквапорин 4 (AQP4). Интересен и другой маркер астроцитов — аквапорин 4 (AQP4),

представляющий собой белок семейства аквапоринов, образующих водопроводящие каналы в клеточных мембранах. Данный белок особенно сильно экспрессируется в концевых ножках, которые находятся в прямом контакте с микрососудами головного мозга [27]. Также установлено, что AQP4 в большей степени сконцентрирован именно в отростках астроцитов [69] (рисунок).

Коннексин (Cx). Стоит отметить, что экспрессия коннексинов (Cx) астроцитами наблюдается по всему головному мозгу с преобладанием Cx43 над Cx30, причем последний, как правило, локализован совместно с Cx43 в щелевых контактах астроцитов [70]. Кроме того, Cx30 экспрессируется исключительно в астроцитах серого вещества, где его распределение весьма неоднородно [70, 71]. Экспрессия коннексинов необходима для формирования астроглиальной сети, способной быстро передавать из клетки в клетку некоторые низкомолекулярные соединения (лактат, АТФ, НАД⁺) или ионы (рисунок).

ALDH1L1, альдолаза С и SOX9. В ходе одного из исследований [33] по изучению генов, экспрессируемых изолированными астроцитами, нейронами и олигодендроцитами, был идентифицирован ALDH1L1, как новый высокоспецифичный астроглиальный маркер, который в отличие от традиционного маркера астроцитов GFAP широко экспрессируется по всему головному мозгу и позволяет выявить сильно разветвленную морфологию астроцитов, включая тело астроцита и его отростки, тогда как GFAP в первую очередь маркирует отростки астроцитов (рисунок). ALDH1L1, также известная как 10-формилтетрагидрофолатдегидрогеназа (FDH) [72], представляет собой фермент метаболизма фолиевой кислоты, который превращает 10-формилтетрагидрофолат (10-формил-ТНФ) в тетрагидрофолат, играющий важную роль во многих реакциях, таких как биосинтез нуклеотидов *de novo* и регенерация метионина, таким образом оказывая большое влияние на деление и рост клеток [31]. Кроме того, существуют данные о потенциальной связи aberrантной экспрессии ALDH1L1 с дефектами нервной трубки во время раннего развития ЦНС [73]. Экспрессия ALDH1L1 изменяется с возрастом, при этом ALDH1L1 также экспрессируется в субпопуляции олигодендроцитов [32]. Кроме того, установлено, что ALDH1L1 маркирует в основном астроциты, локализованные в коре, но при этом отличается довольно слабым окрашиванием астроцитов белого вещества головного мозга [74].

Фермент альдолаза С (фруктозо-1,6-бисфосфатаальдолаза) экспрессируется в большей степени в астроцитах, однако ген альдолазы С был выявлен и в нейронах мозжечка (клетки Пуркинье) [35].

Согласно результатам исследования по изучению экспрессии фактора транскрипции SOX9 как в мозге мыши, так и в мозге человека, обнаружено, что SOX9 почти исключительно экспрессируется астроцитами во взрослом мозге за исключением эпендимных клеток и нейрогенной ниши, где SOX9 также экспрессируется нейрональными клетками-предшественниками (рисунок). Примечательно, что экспрессия SOX9 не снижалась во время старения, а напротив, усиливалась реактивными астроцитами при моделировании бокового амиотрофического склероза на мышцах, а также при окклюзии средней мозговой артерии. Необходимо отметить, что SOX9 является ядерным маркером астроцитов, что не позволяет в полной мере выявить морфологию астроцитов [37].

Интересными являются результаты другого исследования [75], согласно которому CD44 – белок плазматической мембраны и рецептор внеклеточного матрикса – позволяет детально изучить морфологию астроцитов, что, в свою очередь, невозможно сделать при использовании GFAP. Так, CD44-иммунопозитивные астроглиальные клетки с длинными отростками были выявлены в гиппокампе и коре, а также рядом с крупными кровеносными сосудами, причем фенотип данных астроцитов имел сходство с фенотипом фиброзных астроцитов белого вещества, но значительно отличался от фенотипа протоплазматических астроцитов. В то же время были обнаружены и CD44-экспрессирующие астроглиальные клетки с короткими отростками в коре, которые имели сходный фенотип как с протоплазматическими, так и с фиброзными астроцитами (рисунок).

В последнее время в качестве еще одного потенциального маркера астроцитов рассматривают *NDRG2* (N-myc downstream-regulated gene 2) – опухолевый супрессор и ген, связанный с клеточным стрессом, пролиферацией и дифференцировкой клеток. Установлено, что *NDRG2* экспрессируется в различных областях головного мозга, включая кору, обонятельную луковицу, гиппокамп, средней мозг и таламус, причем в двух последних областях уровень экспрессии наиболее высокий [42]. Что наиболее важно, *NDRG2* специфически экспрессируется в астроцитах головного мозга [42, 76]. Кроме того, его экспрессия увеличивалась в клет-

ках глиомы, которые дифференцировались в астроциты, тогда как в реактивных астроцитах экспрессия *NDRG2* значительно снижена [42]. Однако в ряде других исследований убедительно продемонстрировано усиление экспрессии *NDRG2* в реактивных астроцитах при развитии нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [43]. *NDRG2*, возможно, связан с пролиферацией и дифференцировкой глияльных клеток и может рассматриваться как новый астроцитарный маркер, особенно для зрелых, неактивных астроцитов головного мозга (рисунки).

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

Флуоресцентные красители являются важными инструментами для микроскопии, поскольку позволяют изучать структуру и функции нервных клеток без предварительного повреждения или нарушения функций головного мозга [99].

В частности, астроциты можно визуализировать с помощью флуоресцентных красителей, которые можно вводить в интересующие клетки. Для маркировки обычно используют такие красители, как Lucifer yellow, Alexa Fluor, биоцитин, Fuga-2 и другие [45, 99]. Так, флуоресцентный краситель Fuga-2AM (ацетоксиметилловый эфир Fuga-2) используется для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , поскольку имеет высокую чувствительность и специфичность, а также обладает способностью проникать через клеточные мембраны [100].

В качестве альтернативного варианта астроциты могут быть визуализированы с помощью системы Helios Gene Gun для доставки частиц золота и вольфрама, покрытых липофильными красителями, в живые или фиксированные перфузией срезы головного мозга [101]. Данный метод позволяет быстро и дифференцированно маркировать клетки в различных нервных тканях за счет возможности использования смеси красителей, тем самым облегчая оптическое разделение соседних клеток [102].

Большую популярность в экспериментах по визуализации астроцитов получил глиофильный флуоресцентный зонд — катионный краситель сульфородамин 101 и его аналоги, сульфородамин В или G [103]. Сульфородамин избирательно поглощается астроцитами и благодаря цитоплазматической локализации

выявляет клеточную структуру. Более того, сульфородамин легко проникает через гематоэнцефалический барьер, что дает возможность проводить окрашивание астроцитов с помощью внутривенной инъекции сульфородамина В. При этом флуоресценция астроцитов наблюдается уже через 40 мин после инъекции, а окрашивание сохраняется до 5 ч [103]. Такое поглощение сульфородамина 101 астроцитами, по-видимому, опосредуется переносчиками органических анионов, которые экспрессируются в астроцитах в различных областях головного мозга. В результате сульфородамин 101 легко окрашивает астроциты гиппокампа, однако не накапливается в астроцитах, локализованных в вентролатеральном преоптическом ядре [104]. Кроме того, установлено, что в гиппокампе крыс на ранних постнатальных стадиях сульфородамин 101 избирательно маркирует субпопуляцию астроцитов, которая демонстрирует типичные изменения в развитии и характеристики зрелых GFAP-положительных астроцитов [105].

Несмотря на то что сульфородамин 101 успешно маркирует астроциты в острых срезах гиппокампа крыс [105] и в коре головного мозга мышей *in vivo* [103], он также окрашивает и олигодендроциты за счет мультиспецифического переносчика OATP1C1 (*SLCO1C1*), который транспортирует сульфородамин 101 из астроцитов через щелевые контакты панглиальной сети [106].

Аналогичным образом дипептид кумарина, маркер β -Ala-Lys-Nepsilon-Coumarin, специфически маркирует первичные астроциты в культуре клеток, выделенных из ткани головного мозга крысы. Однако при этом данный маркер окрашивает также и клетки-предшественники олигодендроцитов [107].

Интересными являются результаты исследования, согласно которому использование таких флуорофоров, как родамины, цианины и BODIPYs, дает уникальную возможность избирательно и специфично вызывать сильную флуоресценцию астроцитов гиппокампа в головном мозге мыши и крысы, при этом не маркируя нейроны, а также клетки-предшественники микроглии или олигодендроциты [108].

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ МАРКЕРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ЭКСПРЕССИРУЕМЫЕ АСТРОЦИТАМИ

Известно, что астроциты можно визуализировать в срезах головного мозга с помощью флуоресцентных белковых зондов,

избирательно экспрессируемых в астроглии под контролем клеточно-специфических промоторов. Так, были получены трансгенные мыши, у которых астроциты были помечены зеленым флуоресцентным белком (GFP, green fluorescent protein) или его аналогом (EGFP, enhanced green fluorescent protein), экспрессируемым под контролем промотора *GFAP* [109] или промотора гена, кодирующего *S100β* мыши [110], таким образом становясь ценным инструментом для подробного изучения динамических изменений морфологии астроцитов во время развития, а также в патофизиологических условиях.

Стоит отметить, что количество используемых астроглиальных промоторов постоянно увеличивается, и в настоящее время применяются несколько флуоресцентных белковых зондов, имеющих различные спектральные характеристики [111, 112]. Так, была получена серия трансгенных мышей, которые экспрессируют различные флуоресцентные белки рифовых кораллов (RCFP, Reef coral fluorescent proteins), характеризующиеся яркой флуоресценцией, охватывающие широкий спектральный диапазон (от голубого до красного) и управляемые различными промоторами [111].

Астроциты также можно визуализировать посредством экспрессии генетически кодируемых индикаторов Ca^{2+} , таких как желтый Cameleon-Nano 50 (YC-Nano50) [113] или зеленый GCaMP, состоящего из GFP, слитого с кальмодулином и пептидной последовательностью киназы легкой цепи миозина [114]. Более того, согласно результатам ряда исследований, несколько вариантов GCaMP были протестированы в астроцитах, включая GCaMP2, GCaMP3, GCaMP5 и красные RCaMP [115, 116]. Так, введение *N*-концевого 35-членного полиHis RSET (лидерная последовательность плазмиды), связанного с кальмодулином и миозином, приводит к повышению яркости и термостабильности GCaMP2 при сравнении с GCaMP1 [117]. Однако значительное улучшение было реализовано созданием GCaMP3, состоящего из циклически пермутированного зеленого флуоресцентного белка (сrGFP), кальмодулина (CaM) и Ca^{2+} /CaM-связывающего миозина «M13», который имел более высокую яркость, широкий динамический диапазон и большее сродство к Ca^{2+} , позволяя обнаруживать увеличение уровня Ca^{2+} , вызванное отдельными потенциалами действия *in vitro* [118]. GCaMP5 был получен на основе GCaMP3 с использованием направленного мутагенеза и скрининга, что позволило увеличить динамический диапазон в несколь-

ко раз по сравнению с его предшественником GCaMP3 [119]. Для создания красного RCaMP был использован красный флуоресцентный белок (FP) mRuby вместо сrEGFP, который встраивали в каркас GCaMP3, что позволило повысить термодинамическую стабильность [116].

Примечательно, что визуализировать астроциты *in vivo* можно флуоресцентными маркерами с использованием аденоассоциированных вирусных векторов (AAV) и лентивирусных векторов, введение которых позволяет вызвать появление сигналов флуоресценции, специфичных для того или иного типа клеток и локализованных в ядре, что, в свою очередь, дает возможность легко выявлять и различать клетки различной природы. Так, с использованием метода специфической флуоресцентной маркировки нейроны и астроциты были разделены спектрально за счет нейрональной экспрессии красного флуоресцентного белка tdTomato и астроглиальной экспрессии EGFP [120].

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ АСТРОЦИТОВ

Уровни экспрессии мРНК генов характеризуют состояние транскрипции клетки, таким образом обеспечивая понимание ее функции, активности и состояния развития, а также степень патологического ремоделирования при развитии заболевания. Транскриптомный профиль астроцитов головного мозга человека и мыши был охарактеризован с помощью микроматриц и технологий секвенирования РНК в сочетании с такими методами, как флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting) и клеточный пэннинг трансгенно меченных астроцитов [121, 122].

Так, в ходе исследования [123] транскрипции астроглиальных клеток, выделенных *in vivo* из коры головного мозга взрослых трансгенных мышей линии FVB/N-Tg (GFAPGFP) 14Mes/J, с использованием FACS астроцитов, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), обнаружено, что значительная доля экспрессируемых астроцитами генов (около 34%) участвуют в клеточном метаболизме. Вместе с тем в ходе последующего ПЦР-анализа выявлено, что уровень экспрессии ферментов, участвующих в метаболизме гликогена, в астроцитах выше, чем в нейронах. При сравнении относительной экспрессии всех гликолитических ферментов,

участвующих в цепи реакций от фосфорилирования глюкозы до синтеза пирувата, в 7 из 10 стадий гликолиза наблюдалась значительно более высокая экспрессия ферментов в астроцитах по сравнению с нейронами. Более того, в астроцитах наблюдался активный окислительный метаболизм, обусловленный высокой относительной плотностью митохондрий, что указывает на возможность астроцитов вносить значительный вклад в функциональную визуализацию мозга, включая сигналы МРТ, зависящие от уровня кислорода в крови [123].

В другом исследовании [33] у трансгенных мышей линии S100 β -EGFP в возрасте 1–8 и 17–30 дней с помощью FACS были выделены S100 β /EGFP-положительные астроциты, экспрессирующие EGFP под контролем промотора *S100 β* . Сравнение незрелых (1–8 дней) и зрелых (17–30 дней) астроцитов показало, что гены, высокоэкспрессируемые в незрелых астроцитах, участвуют в пролиферации и развитии клеток (например, гены клеточного цикла) и не являются астроцит-специфичными, тогда как гены, экспрессируемые зрелыми астроцитами, специфичны для астроглии. Так, к последним относятся гены, кодирующие такие секретлируемые белки, как ApoE, ApoJ/clusterin, Pla2g7, Sparc, Sparc1 и Mfge, некоторые из которых принимают участие во взаимодействии астроцитов с синапсами или астроцитов с эндотелиальными клетками. Многие из этих генов высоко экспрессируются в астроцитах в возрасте от 1 до 17 дней, что позволяет предположить, что белки, которые они кодируют, играют важную роль в развитии ЦНС во время и после формирования большинства синапсов, что, в свою очередь, согласуется с данными о способности астроцитов регулировать образование синапсов [124]. Более того, в астроцитах был выявлен ряд других генов (*NPAS3*, *MLC1*, *LGII/4* и *GPR56*), которые участвуют в развитии психических заболеваний, таких как шизофрения и биполярное расстройство [125–127]. Так, *NPAS3* – ген фактора транскрипции bHLH (basic helix-loop-helix) домена PAS (Per, Arnt, Sim), кодирующий нейрональный белок 3 домена PAS (*NPAS3*), экспрессируется в глии Бергмана в мозжечке [128]. Белок *NPAS3* принимает участие в регуляции нейрогенеза, циркадного ритма и пролиферации клеток. Мутация гена *NPAS3* является фактором риска психических расстройств [129]. У мышей делеция гена *NPAS3* вызывает развитие нарушений нейрогенеза и синаптической передачи в гиппокампе [130]. Ген *MLC1*, кодирующий мембранный белок *MLC1*, специфически экспрессируется в

дистальных астроглиальных отростках в периваскулярной, субэпендимальной и субпиалярной областях головного мозга и содержит несколько трансмембранных доменов, что предполагает выполнение данным белком транспортной функции [125]. Ген *LGII/4* представляет собой богатый лейцином, инактивированный в глиоме ген, который экспрессируется в астроцитах и играет важную роль в синаптической передаче и миелинизации. Так, *LGII/4* принимает участие в регуляции пролиферации глии в ПНС, а также, связываясь с нейронным рецептором ADAM22, способствует миелинизации аксонов шванновскими клетками [131]. Ген *GPR56* кодирует белки семейства рецепторов, связанных с G-белком адгезии – рецептор 56, связанный с G-белком (*GPR56*). Данный ген экспрессируется как в микроглии, олигодендроцитах и астроцитах, так и в нейрональных клетках-предшественниках и развивающихся нейронах [132, 133], принимает участие в миелинизации, пролиферации [134] и синаптогенезе [135].

Это дает возможность расширить понимание о степени вклада астроцитов в синаптическую регуляцию и развитие неврологических и психических заболеваний [136]. Действительно, согласно недавно полученным данным, астроциты могут принимать непосредственное участие в опосредовании элиминации синапсов в развивающемся и взрослом мозге, что, в свою очередь, играет важную роль в постоянном ремоделировании синаптической архитектуры головного мозга [137].

Интересным явилось исследование по изучению профиля транскрипции реактивной астроглии на астроцитах, выделенных с помощью FACS от взрослых трансгенных мышей линии *Aldh1l1-EGFP* после моделирования травмы головного мозга [61]. Обнаружено, что реактивные астроциты выражено изменяют свой транскрипционный профиль, а именно: основные изменения выявлены в генах, кодирующих белки внеклеточного матрикса – коллаген (*Col12a1*, *Col6a1*) и версикан (*Vcan*), тромбоспондин (*Thbs1*) и фибулин 5 (*Fbln5*), *CD44* и нейрофасцин (*Nfasc*), что указывает о способности реактивных астроцитов изменять внеклеточный матрикс при формировании глиального рубца. Аналогично, гены, кодирующие белки промежуточных филаментов (*GFAP*, виментин и нестин), высоко экспрессировались в реактивных астроцитах, тем самым отражая морфологические изменения, которые происходят при активации. Кроме того, выявлена группа генов, кодирующих цитокины, белки презентации антигена и пути

системы комплемента, экспрессия которых значительно увеличена в реактивных астроцитах, что предполагает регуляторную роль астроцитов при взаимодействии с клетками иммунной системы в результате повреждения [61].

Важно отметить, что при сравнении транскриптомов нескольких популяций астроцитов, экспрессирующих специфические клеточные маркеры, например, GFAP- против GLT-1-положительных астроцитов [123], ALDH1L1- против GLT-1-положительных астроцитов [32] и ALDH1L1- против GlialCAM-иммунопозитивных астроцитов [138], не было обнаружено выраженных различий между этими популяциями клеток, что указывает на то, что маркеры коэкспрессируются в большинстве астроцитов.

Одним из способов определить молекулярную гетерогенность астроцитов является использование транскриптомного анализа одиночных клеток. В ходе проведения нескольких исследований была собрана информация о транскриптоме отдельных астроцитов [47, 139], однако они не включали дальнейшего описания гетерогенности астроцитов. Однако в результате проведения крупномасштабного исследования по секвенированию одноклеточной РНК клеток коры и CA1 области гиппокампа мышей, было идентифицировано два подкласса астроцитов — GFAP и Mfge8. При этом астроциты, экспрессирующие GFAP, составляли пограничную глиальную мембрану — верхний слой нервной ткани головного мозга, лежащий непосредственно под мягкой мозговой оболочкой, тогда как второй подкласс астроцитов располагался более равномерно в коре и характеризовался меньшей разветвленностью отростков [47].

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ АСТРОЦИТОВ

Оптогенетика представляет собой ценный инструмент для изучения реакции астроцитов на передачу сигналов, специфичных для различных типов нейронов, с помощью светочувствительных белков — опсинов, которые включают микробные ионные каналы и ионные насосы, а также сконструированные GPCR [140]. Поглощение света определенной длины волны опсином вызывает конформационные изменения, которые запускают разнообразные изменения в клетках, экспрессирующих опсин. При этом некоторые опсины (канальный родопсин 2 (ChR2),

галородопсин, археродопсин (Arch), археродопсин-Т (Arch-T)) индуцируют транслокацию ионов [141–143], а другие (меланопсин) — активируют внутриклеточные сигнальные каскады, такие как передача сигналов, опосредованная G-белком [144].

Важно, что оптогенетика позволяет избирательно нацеливаться на определенные клеточные популяции, в частности, астроциты, и оказывать направленное воздействие, что, в свою очередь, дает возможность осуществлять более глубокий и детальный анализ их функций в ЦНС [8]. В ходе проведения ряда исследований было продемонстрировано, что оптогенетическая стимуляция астроцитов посредством экспрессии светочувствительных ионных каналов и рецепторов приводит к выраженным изменениям их функциональной пластичности [145, 146].

Установлено, что стимуляция Opto-a1AR (метаботропный опсин), экспрессируемого в астроцитах гиппокампа, может усиливать долговременную синаптическую пластичность у мышей, тогда как катионный мембранный канал ChR2 (ионотропный опсин) не дает столь выраженного эффекта. Это показывает, что долгосрочную синаптическую пластичность возможно модулировать оптогенетически, что может быть использовано для нормализации синаптической передачи и коррекции нарушений пластичности при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, в частности болезни Альцгеймера [147].

Показано, что оптическая активация астроцитов ChR2 может стимулировать высвобождение АТФ, что, в свою очередь, усиливает возбуждающую передачу сигналов в синапсах за счет стимуляции рецепторов P2Y1 и A2A [148]. Однако в недавно проведенном исследовании с использованием оригинального приема, основанного на сочетанном применении генетически кодируемых индикаторов Ca^{2+} — GCaMP6f в астроцитах и селективной экспрессии меланопсина (фотопигмента, связанного с G-белком) в астроцитах для запуска передачи сигналов Ca^{2+} , показано, что меланопсин способен стимулировать инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3)-зависимые Ca^{2+} -сигналы в астроцитах и вызывать АТФ-зависимое временное усиление возбуждающей синаптической передачи в гиппокампе посредством пуринергической активации рецепторов P2Y1 и A2A. При этом в отличие от меланопсина астроглиальные сигналы Ca^{2+} , вызванные стимуляцией ChR2, были зафиксированы после более длинных световых импульсов (более 5 секунд). Кроме того, в усло-

виях низкочастотной световой стимуляции астроциты, трансфицированные меланопсином, могут вызывать долговременную потенциацию, что активирует эпизодическую память, тем самым делая меланопсин оптическим инструментом для регуляции широкого спектра действий астроцитов в нейронных сетях *in vivo* [144].

В другом исследовании с использованием взрослых мышей (2–5 месяцев) линии tTAMIC1-tetO-ChR2(C128S)-EYFP (разработка Tanaka et al. [149]) оценивали устойчивый ответ Ca^{2+} в астроцитах при их направленной световой стимуляции в неокортексе. Данная модель трансгенных мышей экспрессирует высокочувствительный к свету мутантный катионный канал ChR2 (C128S) в астроцитах (с промотором *MIC1*), который открывается в синей области спектра и закрывается – в оранжевой, что позволило в данном исследовании использовать комбинированный подход, основанный на оптогенетической стимуляции ChR2 в сочетании с визуализацией активности Ca^{2+} в астроцитах с помощью индикатора Ca^{2+} – Rhod-2 AM (красная область спектра). Это дает возможность оценить активацию/возбудимость астроцитов и определить их роль в патогенезе некоторых заболеваний головного мозга, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [150].

Более того, изучая влияние стимуляции астроцитов на обработку информации пирамидальными нейронами слоя 5 (L5PN), установлено, что оптогенетическая активация астроцитов вблизи тела клетки L5PN пролонгирует их возбуждение. Выявленные эффекты связаны с высвобождением S100 β – астроцитарного Ca^{2+} -связывающего белка, который снижает концентрацию внеклеточного Ca^{2+} при высвобождении его из клетки во внеклеточное пространство. При этом уменьшение концентрации внеклеточного Ca^{2+} вызывает возбуждение L5PN, опосредованное активацией ионных каналов Nav1.6 [151].

Интересным является и недавно установленный факт того, что вызванная за счет хронической оптогенетической активации ChR2 эксайтотоксичность глии Бергмана вызывает снижение захвата глутамата, проявляющееся удлинением возбуждающих постсинаптических токов в клетках Пуркинье, что согласуется с документально подтвержденным снижением экспрессии транспортера глутамата EAAT-1 [152].

В другом исследовании для оценки роли физиологической активации астроцитов *in vivo* была создана линия трансгенных мы-

шей Opto α 1AR TG, у которых астроциты экспрессируют оптогенетически активируемый Gq-GPCR Opto α 1AR, фотостимуляция которого обеспечивает временное повышение астроцитарного Ca^{2+} , что фиксировали с помощью Rhod-2 AM [153]. Это позволило изучить влияние модуляции активности астроцитов на активность нейронов, опосредованное передачей сигналов Gq в астроцитах. Так, оптогенетическая активация передачи сигналов Gq в астроцитах в коре временно ингибировала активность нейронов через аденозиновый рецептор A1. Кроме того, сенсорная стимуляция в сочетании с активацией астроцитов индуцировала длительную депрессию сенсорно-вызванного ответа. Согласно результатам поведенческого тестирования, активация астроцитов приводила к улучшению долговременной памяти (тест «Распознавание новых объектов»), однако не оказывала значимого влияния на кратковременную память (тест «Y-лабиринт») [153].

Учитывая тот факт, что световая активация астроцитов ChR2 изменяет динамику базального уровня Ca^{2+} [154], использование в исследовании такого подхода, как математическое моделирование, может иметь важное значение для прогнозирования того, как биофизические свойства конструкции ChR2, а также характеристики лазера могут влиять на передачу сигналов Ca^{2+} астроцитами. В этом аспекте создание математической модели даст возможность оптимизировать схему световой стимуляции с целью достижения желаемого уровня Ca^{2+} в астроцитах, а также разработать новые прикладные конструкции, специфически ориентированные на детальное изучение роли астроглиальных клеток в головном мозге [155].

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ В ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

В результате воздействия негативных стимулов, способствующих повреждению нейронов, астроциты претерпевают ряд фенотипических и функциональных изменений, что сопровождается развитием реактивного астроглиоза. При этом наблюдается гипертрофия и повышенная экспрессия GFAP, что и формирует характерный фенотип реактивных астроцитов, которые, в свою очередь, пролиферируют, мигрируют и превращаются в астроциты, образующие рубцы [156]. Как реактивные астроциты, так и астроциты, образу-

шие рубцы, высоко экспрессируют ряд белков-маркеров, а именно: GFAP, β -катенин-1, нестин и N-кадгерин. Однако существуют и специфические маркерные гены, в частности, гены-маркеры реактивных астроцитов – матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2) (кодирует белок MMP-2), *PLAUR* (кодирует белок-рецептор активатора плазминогена урокиназы (suPAR)), матриксная металлопротеиназа-13 (MMP-13, кодирующая белок коллагеназу 3), *Axin-2* (кодирует аксиноподобный белок-2), ген, кодирующий белок промежуточных филаментов – нестин и *CTNNB1* (кодирует белок β -катенин-1), тогда как к генам-маркерам астроцитов, образующих рубцы, относятся *Cdh2* (кодирует белок N-кадгерин), *SOX9* (кодирует белок фактор транскрипции SOX-9), а также гены, связанные с протеогликанами хондроитинсульфата – *CSGALNACT1* (кодирует белок хондроитинсульфат N-ацетилгалактозаминилтрансферазу 1), *CHST11* (кодирует белок карбогидратсульфотрансферазу 11), *ACAN* (кодирует белок агрекан протеогликанов) и *SLIT2* (кодирует белок-гомолог Slit 2) [156]. Таким образом, представленные гены-маркеры в сочетании с морфологическими характеристиками астроцитов могут быть использованы для определения их фенотипа.

Известны два типа реактивных астроцитов – A1 и A2. Реактивные астроциты A1 продуцируют провоспалительные цитокины, которые могут вызывать гибель нейронов, тогда как реактивные астроциты A2 активируют нейротрофические факторы, которые способствуют выживанию и росту нейронов [157]. Важно отметить, что данные типы реактивных астроцитов можно идентифицировать в соответствии с их индивидуальными генетическими характеристиками. Так, в ходе исследования посмертной ткани головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, болезнью Паркинсона, боковым амиотрофическим склерозом и рассеянным склерозом выявлено, что наиболее высоко в астроцитах A1 экспрессируется компонент 3 (C3). При этом в посмертной ткани головного мозга пациентов с рассеянным склерозом в астроцитах A2 экспрессируют единственный маркер – *S100A10* [158]. Это дает возможность использовать данные гены в качестве специфических маркеров астроцитов A1 и A2 соответственно.

Активированная микроглия вызывает трансформацию астроцитов в астроциты A1 путем высвобождения цитокинов IL-1 α , TNF и C1q, каждый из которых важен для индукции

астроцитов A1 [158]. При этом Mfge8 регулирует астроцитарную конверсию A1/A2 посредством активации PI3K/Akt-пути и подавления NF- κ B-пути.

Напротив, астроциты A2 оказывают нейротрофическое действие на нервную ткань, секретировав несколько нейротрофических факторов. Ген *S100a10*, экспрессируемый астроцитами A2, необходим для пролиферации клеток, восстановления мембран и ингибирования апоптоза клеток [158]. Более того, астроциты A2 способствуют экспрессии противовоспалительного цитокина, трансформирующего фактора роста-бета (TGF β , Transforming growth factor-beta), который участвует в синаптогенезе и играет нейротрофическую роль.

Интересными являются результаты одного из исследований по изучению нескольких фенотипов активированных астроцитов и задействованных при этом регуляторных механизмов [159]. Установлено, что активированные астроциты *in vitro* и *in vivo* проявляют два различных функциональных фенотипа в отношении экспрессии про- или противовоспалительных генов, экспрессии глиального фибриллярного кислого белка и нейротоксической или нейротрофической активности. Также показано, что активированные астроциты высвобождают белок липокалин-2 (LCN2), который регулирует как морфологическую трансформацию астроцитов, связанную с реактивным астроглиозом, так миграцию и апоптоз. Более того, LCN2 способствует провоспалительной активации астроцитов, но в то же время ингибирует передачу сигналов по IL-4/STAT6-пути, участвуя в альтернативной противовоспалительной активации. Это дает возможность предполагать, что секретируемый астроцитами белок LCN2 является аутокринным модулятором функциональной поляризации астроцитов при развитии нейровоспаления и может быть направлен на подавление провоспалительной активации астроцитов и связанных с этим нейродегенеративных заболеваний [159, 160].

МикроРНК АСТРОЦИТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

МикроРНК представляют собой небольшие регуляторные РНК длиной 21–24 нуклеотида, участвующие в посттранскрипционной регуляции генов. МикроРНК связываются с ин-

формационными (матричными) РНК (мРНК) на основе комплементарности, что приводит к деградации последних или подавлению трансляции [161]. Более того, микроРНК обладают потенциалом для регулирования сотен различных транскриптов [162]. Одной из важных особенностей микроРНК является их возможность транспортироваться от одной клетки к другой через экзосомы, что позволяет микроРНК оказывать широкое влияние на уровне тканей и организма в целом [163].

Известно, что практически все клетки секретируют экзосомы [164]. Так, результаты недавно проведенного исследования [165] по изучению молекулярного состава экзосом, выделяемых астроцитами и нейронами во внеклеточное пространство и обеспечивающих межклеточную коммуникацию путем переноса различных молекул (белков, РНК, липидов), показали, что как астроциты, так и нейроны избирательно включают в экзосомы только часть клеточных микроРНК. При этом существование различия в профилях микроРНК между экзосомами и соответствующими им клетками предполагают, что процесс отбора микроРНК в экзосомы четко регулируется и может иметь клеточную специфичность.

Как острое, так и хроническое повреждение ЦНС вызывает реактивные структурно-функциональные изменения в астроцитах, что определяется, как реактивный астроглиоз. Нарушение функций астроцитов может в значительной степени способствовать прогрессированию патологического процесса за счет активации эксайтотоксичности, окислительного стресса и воспалительных реакций [166]. Нейродегенеративные заболевания, а именно: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз характеризуются нейровоспалением, когнитивной и двигательной дисфункцией. Это связано с необратимой дегенерацией нейронов в головном и спинном мозге и апоптозом. Однако растущее количество экспериментальных данных демонстрирует важную роль астроцитов в патогенезе хронических нейродегенеративных заболеваний [167].

Нарушение регуляции экспрессии генов является характерным признаком как физиологического старения, так и нейродегенеративных заболеваний [168]. Согласно результатам ряда исследований, микроРНК принимают участие в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, регулируя функцию астроцитов за счет различных механизмов, и таким образом, могут выступать в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

Так, у мышей с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия 3xTg-AD) выявлено увеличение уровня miR-181a, которая подавляет экспрессию некоторых синаптических белков в астроцитах, в частности, GLT-1, осуществляющего регуляцию синаптической пластичности [169]. Более того, наблюдалась активация miR-155 и c-Jun на фоне индуцированного бета-амилоидом увеличения активности микроглии и астроцитов, что способствовало выработке медиаторов воспаления, таких как IL-6 (интерлейкин-6) и IFN- β (интерферон-бета) [170].

Показано, что у мышей с моделью болезни Альцгеймера (линия APP^{swe}/PS1/E9) активация астроглиального SEBPD (ССААТ/энхансер-связывающий белок дельта – ключевой фактор транскрипции при воспалении в ткани головного мозга) приводит к нарушению пространственного обучения и запоминания за счет активации miR-135a, ингибирующей активность нейротропного фактора Thbs1 (тромбоспондин 1), что, в свою очередь, подавляет синаптогенез, а также снижает рост дендритов и прораствание аксонов нейронов [171].

Болезнь Паркинсона связана с различными патологическими факторами, включая токсичность α -синуклеина и другие механизмы. Обнаружено, что сывороточные концентрации miR-153 и miR-223 прогрессивно снижались у мышей дикого типа (WT) и мышей с генетической моделью болезни Паркинсона (линия GFAP.HMOX1) [172]. Кроме того, циркулирующие уровни обеих микроРНК были ниже у трансгенных мышей по сравнению с контрольными мышами WT, в то время как концентрации белка α -синуклеина были повышены у мышей GFAP.HMOX1 по сравнению со значениями для мышей WT. Это дает возможность предполагать, что miR-153 и miR-223 отрицательно регулируют α -синуклеин в базальных ганглиях у мышей GFAP.HMOX1 [172].

Заслуживает внимания и другое проведенное исследование [173] по оценке влияния внеклеточных везикул, секретируемых астроцитами, которые были выделены от пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, на выживаемость двигательных нейронов. Обнаружено, что внеклеточные везикулы не только вызывают гибель двигательных нейронов, но и содержат микроРНК, которые негативно регулируют экспрессию генов, в частности, miR-494-3p подавляет различные гены, включая ген, кодирующий семафорин 3A (SEMA3A), участвующий в росте и поддержании аксонов.

Примечательно и то, что микроРНК, выделенная из поврежденных в ходе развития боко-

вого амиотрофического склероза двигательных нейронов, может оказывать непосредственное негативное влияние на структурно-функциональную целостность астроцитов, что в значительной мере интенсифицирует дегенерацию нейронов [174]. В частности, *in vitro* показано, что астроциты способны поглощать нейрональную miR-218, которая, в свою очередь, ингибирует активность транспортера глутамата EAAT-2 в астроцитах за счет прямого воздействия на 3'-UTR EAAT-2, содержащего несколько сайтов связывания miR-218. Однако блокирование miR-218 заметно увеличивает уровень EAAT-2 в астроцитах у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза, что делает данную биомолекулу перспективной терапевтической мишенью. Таким образом, дисфункция астроцитов и реактивный астроглиоз, как ответная реакция на повреждение двигательных нейронов при развитии бокового амиотрофического склероза, может быть опосредована повышенной активностью микроРНК, высвобождаемой из поврежденных нейронов [174].

В совокупности, представленные экспериментальные данные *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют, что микроРНК вносят существенный вклад в патогенез нейродегенеративных заболеваний, регулируя прямо или опосредованно функции астроцитов, это находит свое отражение в активации провоспалительных цитокинов, подавлении синаптогенеза, гибели нейронов и митохондриальной дисфункции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Астроциты служат фундаментальными регуляторами в развитии и гомеостазе головного мозга, а также при возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний. Важной особенностью и одновременно сложностью для исследователей является гетерогенность астроцитов, которая заключается в

проявлении различных морфологических характеристик в зависимости от локализации в той или иной области головного мозга. В связи с этим детальное изучение экспрессии генов и функциональных особенностей астроцитов в различных областях мозга имеет первостепенное значение. К сожалению, эта задача полностью не решена до сих пор из-за отсутствия универсального маркера астроглиальных клеток, характерных для той или иной области мозга. Более того, не идентифицировано ни одного «идеального» промотора, специфичного для астроглии, обеспечивающего экспрессию репортерных генов исключительно в клетках данного типа.

Поэтому изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе межклеточного взаимодействия между астроцитами и нейронами, а также открытие новых функций астроглиальных клеток является вескими основаниями для поиска новых маркеров активации астроцитов и методов их визуализации. При этом комбинирование методов визуализации с другими современными протоколами (ПЦР-анализ, электрофизиология, оптогенетика) позволит более детально изучить многогранность функций астроцитов, что будет иметь решающее значение для понимания биологии астроглии в здоровой и поврежденной ткани центральной нервной системы.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-65-46004).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montgomery, D. L. (1994) Astrocytes: form, functions, and roles in disease, *Vet. Pathol.*, **31**, 145-167, doi: 10.1177/030098589403100201.
2. Montana, V., Flint, D., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., and Pappas, V. (2021) Two metabolic fuels, glucose and lactate, differentially modulate exocytotic glutamate release from cultured astrocytes, *Neurochem. Res.*, **46**, 2551-2579, doi: 10.1007/s11064-021-03340-y.
3. Kumar, R., Huang, Y.-T., Chen, C.-C., Tzeng, S.-F., and Chan, C.-K. (2020) Astrocytic regulation of synchronous bursting in cortical cultures: from local to global, *Cerebral Cortex Commun.*, **1**, tga053, doi: 10.1093/texcom/tga053.
4. Honoré, E., Khlaifia, A., Bosson, A., and Lacaille, J.-C. (2021) Hippocampal somatostatin interneurons, long-term synaptic plasticity and memory, *Front. Neural. Circuits*, **15**, 687558, doi: 10.3389/fncir.2021.687558.
5. Welser-Alves, J. V., Crocker, S. J., and Milner, R. (2011) A dual role for microglia in promoting tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) expression in

- glial cells in response to neuroinflammatory stimuli, *J. Neuroinflamm.*, **8**, 61, doi: 10.1186/1742-2094-8-61.
6. Stackhouse, T. L., and Mishra, A. (2021) Neurovascular coupling in development and disease: focus on astrocytes, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 702832, doi: 10.3389/fcell.2021.702832.
 7. Santello, M., Toni, N., and Volterra, A. (2019) Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment, *Nat. Neurosci.*, **22**, 154-166, doi: 10.1038/s41593-018-0325-8.
 8. McNeill, J., Rudyk, C., Hildebrand, M. E., and Salmaso, N. (2021) Ion channels and electrophysiological properties of astrocytes: implications for emergent stimulation technologies, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 644126, doi: 10.3389/fncel.2021.644126.
 9. Gómez-Gonzalo, M., Zehnder, T., Requeie, L. M., Bezz, I. P., and Carmignoto, G. (2018) Insights into the release mechanism of astrocytic glutamate evoking in neurons NMDA receptor-mediated slow depolarizing inward currents, *Glia*, **66**, 2188-2199, doi: 10.1002/glia.23473.
 10. Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., et al. (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory, *Neuron*, **98**, 935-944, doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.034.
 11. Sardar, D., Lozzi, B., Woo, J., Huang, T.-W., Cvetkovic, C., et al. (2021) Mapping astrocyte transcriptional signatures in response to neuroactive compounds, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3975, doi: 10.3390/ijms22083975.
 12. Gómez-Gonzalo, M., Martin-Fernandez, M., Martínez-Murillo, R., Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., et al. (2017) Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain: neuron-astrocyte signaling in aging brain, *Glia*, **65**, 569-580, doi: 10.1002/glia.23112.
 13. Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018) Physiology of astroglia, *Physiol. Rev.*, **98**, 239-389, doi: 10.1152/physrev.00042.2016.
 14. Middeldorp, J., and Hol, E. M. (2011) GFAP in health and disease, *Progr. Neurobiol.*, **93**, 421-443, doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
 15. Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., and Finch, C. E. (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain, *Neurobiol. Aging*, **14**, 421-429, doi: 10.1016/0197-4580(93)90100-P.
 16. Garcia, A. D. R., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., and Sofroniew, M. V. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain, *Nat. Neurosci.*, **7**, 1233-1241, doi: 10.1038/nn1340.
 17. Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bogerts, B., Gos, T., Richter-Landsberg, C., et al. (2008) S100 β is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation, *Neuroscience*, **154**, 496-503, doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.060.
 18. Steiner, J., Bernstein, H.-G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., et al. (2007) Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100 β in human brain, *BMC Neurosci.*, **8**, 2, doi: 10.1186/1471-2202-8-2.
 19. Marichal, N., García, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., and Russo, R. E. (2012) Spatial domains of progenitor-like cells and functional complexity of a stem cell niche in the neonatal rat spinal cord, *Stem Cells*, **30**, 2020-2031, doi: 10.1002/stem.1175.
 20. Schmitt, A., Asan, E., Lesch, K.-P., and Kugler, P. (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system, *Neuroscience*, **109**, 45-61, doi: 10.1016/S0306-4522(01)00451-1.
 21. Lehre, K., Levy, L., Ottersen, O., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations, *J. Neurosci.*, **15**, 1835-1853, doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-01835.1995.
 22. Anlauf, E., and Derouiche, A. (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization, *Front. Endocrinol.*, **4**, 144, doi: 10.3389/fendo.2013.00144.
 23. Bernstein, H.-G., Bannier, J., Meyer-Lotz, G., Steiner, J., Keilhoff, G., et al. (2014) Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial protein localization, *J. Chem. Neuroanatomy*, **61-62**, 33-50, doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.07.003.
 24. Morrow, C. S., Porter, T. J., Xu, N., Arndt, Z. P., Ako-Asare, K., et al. (2020) Vimentin coordinates protein turnover at the aggresome during neural stem Cell quiescence exit, *Cell Stem Cell*, **26**, 558-568, doi: 10.1016/j.stem.2020.01.018.
 25. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., and Snider, N. T. (2018) Vimentin on the move: new developments in cell migration, *F1000Res.*, **7**, 1796, doi: 10.12688/f1000research.15967.1.
 26. Pattabiraman, S., Azad, G. K., Amen, T., Brielle, S., Park, J. E., et al. (2020) Vimentin protects differentiating stem cells from stress, *Sci. Rep.*, **10**, 19525, doi: 10.1038/s41598-020-76076-4.
 27. Lisjak, M., Potokar, M., Zorec, R., and Jorgačevski, J. (2020) Indirect role of AQP4b and AQP4d isoforms in dynamics of astrocyte volume and orthogonal arrays of particles, *Cells*, **9**, 735, doi: 10.3390/cells9030735.
 28. Wen, H., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O. P., et al. (1999) Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel: Aquaporin-4 and brain development, *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 935-945, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00502.x.
 29. Giaume, C., Naus, C. C., Sáez, J. C., and Leybaert, L. (2021) Glial connexins and pannexins in the healthy and diseased brain, *Physiol. Rev.*, **101**, 93-145, doi: 10.1152/physrev.00043.2018.
 30. Griemsmann, S., Höft, S. P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., et al. (2015) Characterization of

- Panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells, *Cereb. Cortex*, **25**, 3420-3433, doi: 10.1093/cercor/bhu157.
31. Krupenko, S. A. (2009) FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism, *Chem. Biol. Interact.*, **178**, 84-93, doi: 10.1016/j.cbi.2008.09.007.
 32. Yang, Y., Videny, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., et al. (2011) Molecular comparison of GLT1⁺ and ALDH1L1⁺ astrocytes *in vivo* in astroglial reporter mice, *Glia*, **59**, 200-207, doi: 10.1002/glia.21089.
 33. Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., et al. (2008) A Transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function, *J. Neurosci.*, **28**, 264-278, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
 34. Shiokawa, K., Kajita, E., Hara, H., Yatsuki, H., and Hori, K. (2002) A developmental biological study of aldolase gene expression in *Xenopus laevis*, *Cell Res.*, **12**, 85-96, doi: 10.1038/sj.cr.7290114.
 35. Walther, E. U., Dichgans, M., Maricich, S. M., Romito, R. R., Yang, F., et al. (1998) Genomic sequences of aldolase C (Zebrin II) direct lacZ expression exclusively in non-neuronal cells of transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2615-2620, doi: 10.1073/pnas.95.5.2615.
 36. Thompson, R. J., Kynoch, P. A. M., and Willson, V. J. C. (1982) Cellular localization of aldolase C subunits in human brain, *Brain Res.*, **232**, 489-493, doi: 10.1016/0006-8993(82)90294-3.
 37. Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M. J., et al. (2017) SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions, *J. Neurosci.*, **37**, 4493-4507, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017.
 38. Neyrinck, K., Van Den Daele, J., Vervliet, T., De Smedt, J., Wierda, K., et al. (2021) SOX9-induced generation of functional astrocytes supporting neuronal maturation in an all-human system, *Stem Cell Rev. Rep.*, **17**, 1855-1873, doi: 10.1007/s12015-021-10179-x.
 39. Moretto, G., Xu, R. Y., and Kim, S. U. (1993) CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **52**, 419-423, doi: 10.1097/00005072-199307000-00009.
 40. Dzwonek, J., and Wilczynski, G. M. (2015) CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 175, doi: 10.3389/fncel.2015.00175.
 41. Naruse, M., Shibusaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M., and Ishizaki, Y. (2013) Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum, *PLoS One*, **8**, e53109, doi: 10.1371/journal.pone.0053109.
 42. Shen, L., Zhao, Z.-Y., Wang, Y.-Z., Ji, S.-P., Liu, X.-P., et al. (2008) Immunohistochemical detection of Ndr2 in the mouse nervous system, *NeuroReport*, **19**, 927-931, doi: 10.1097/WNR.0b013e32830163d0.
 43. Tao, L., Zhu, Y., Wang, R., Han, J., Ma, Y., et al. (2020) N-myc downstream-regulated gene 2 deficiency aggravates memory impairment in Alzheimer's disease, *Behavioural Brain Res.*, **379**, 112384, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112384.
 44. Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C.-L., Kindblom, L. G., Liem, R., et al. (1998) GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation *in vitro* when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density, *Exp. Cell Res.*, **239**, 332-343, doi: 10.1006/excr.1997.3922.
 45. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., and Ellisman, M. H. (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains, *J. Neurosci.*, **22**, 183-192, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002.
 46. Van Den Berge, S. A., Middeldorp, J., Zhang, C. E., Curtis, M. A., Leonard, B. W., et al. (2010) Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP- δ : GFAP- δ in aged human SVZ stem cells, *Aging Cell*, **9**, 313-326, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00556.x.
 47. Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A. B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., et al. (2015) Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq, *Science*, **347**, 1138-1142, doi: 10.1126/science.aaa1934.
 48. Hu, J., and Van Eldik, L. J. (1996) S100 β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1313**, 239-245, doi: 10.1016/0167-4889(96)00095-X.
 49. Xiong, Z., O'Hanlon, D., Becker, L. E., Roder, J., MacDonald, J. F., et al. (2000) Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100 β null mice, *Exp. Cell Res.*, **257**, 281-289, doi: 10.1006/excr.2000.4902.
 50. Bianchi, R., Verzini, M., Garbuglia, M., Giambanco, I., and Donato, R. (1994) Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1223**, 354-360, doi: 10.1016/0167-4889(94)90095-7.
 51. Villarreal, A., Seoane, R., González Torres, A., Rosciszewski, G., Angelo, M. F., et al. (2014) S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis, *J. Neurochem.*, **131**, 190-205, doi: 10.1111/jnc.12790.
 52. Nishiyama, H., Knöpfel, T., Endo, S., and Itohara, S. (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4037-4042, doi: 10.1073/pnas.052020999.
 53. Heizmann, C. W. (2019) S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1866**, 1197-1206, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.10.015.
 54. Ogata, K., and Kosaka, T. (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hip-

- pocampus, *Neuroscience*, **113**, 221-233, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00041-6.
55. Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., et al. (2019) The appropriate marker for astrocytes: comparing the distribution and expression of three astrocytic markers in different mouse cerebral regions, *Biomed. Res. Int.*, **9605265**, doi: 10.1155/2019/9605265.
56. Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., et al. (2005) Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage, *Glia*, **51**, 81-97, doi: 10.1002/glia.20184.
57. Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R., and Skibo, G. G. (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity, *Neuroscience*, **96**, 195-203, doi: 10.1016/S0306-4522(99)00538-2.
58. Rickmann, M., and Wolff, J. R. (1995) S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain, *Neuroscience*, **67**, 977-991, doi: 10.1016/0306-4522(94)00615-C.
59. Zimmer, D. B., Chaplin, J., Baldwin, A., and Rast, M. (2005) S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases, *Cell Mol. Biol.*, **51**, 201-214.
60. Milosevic, A., Liebmann, T., Knudsen, M., Schintu, N., Svenningsson, P., et al. (2017) Cell- and region-specific expression of depression-related protein p11 (S100a10) in the brain, *J. Comp. Neurol.*, **525**, 955-975, doi: 10.1002/cne.24113.
61. Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., et al. (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis, *J. Neurosci.*, **32**, 6391-6410, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
62. Furuta, A., Rothstein, J. D., and Martin, L. J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development, *J. Neurosci.*, **17**, 8363-8375, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08363.1997.
63. Walz, W., and Lang, M. K. (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus, *Neurosci. Lett.*, **257**, 127-130, doi: 10.1016/S0304-3940(98)00813-1.
64. Yeh, C.-Y., Verkhratsky, A., Terzieva, S., and Rodríguez, J. J. (2013) Glutamine synthetase in astrocytes from entorhinal cortex of the triple transgenic animal model of Alzheimer's disease is not affected by pathological progression, *Biogerontology*, **14**, 777-787, doi: 10.1007/s10522-013-9456-1.
65. Norenberg, M. D., and Martinez-Hernandez, A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain, *Brain Res.*, **161**, 303-310, doi: 10.1016/0006-8993(79)90071-4.
66. Sancho-Tello, M., Vallés, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures, *Glia*, **15**, 157-166, doi: 10.1002/glia.440150208.
67. Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallén, Å., et al. (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin, *J. Cell Biol.*, **145**, 503-514, doi: 10.1083/jcb.145.3.503.
68. Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhashtonay, C., et al. (1981) Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 298-302, doi: 10.1073/pnas.78.1.298.
69. Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F.-M., Laake, J. H., et al. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in müller cells and fibrous astrocytes, *J. Neurosci.*, **18**, 2506-2519, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-07-02506.1998.
70. Nagy, J. I., Patel, D., Ochalski, P. A. Y., and Stelmack, G. L. (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance, *Neuroscience*, **88**, 447-468, doi: 10.1016/S0306-4522(98)00191-2.
71. Theis, M., and Giaume, C. (2012) Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity, *Brain Res.*, **1487**, 88-98, doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.045.
72. Neymeyer, V., Tephly, T. R., and Miller, M. W. (1997) Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH) expression in the central nervous system of the mature rat, *Brain Res.*, **766**, 195-204, doi: 10.1016/S0006-8993(97)00528-3.
73. Anthony, T. E., and Heintz, N. (2007) The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects, *J. Comp. Neurol.*, **500**, 368-383, doi: 10.1002/cne.21179.
74. Waller, R., Woodroffe, M. N., Wharton, S. B., Ince, P. G., Francese, S., et al. (2016) Gene expression profiling of the astrocyte transcriptome in multiple sclerosis normal appearing white matter reveals a neuroprotective role, *J. Neuroimmunol.*, **299**, 139-146, doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.09.010.
75. Sosunov, A. A., Wu, X., Tsankova, N. M., Guilfoyle, E., McKhann, G. M., et al. (2014) Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain, *J. Neurosci.*, **34**, 2285-2298, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014.
76. Nichols, N. R. (2003) Ndr2, a novel gene regulated by adrenal steroids and antidepressants, is highly expressed in astrocytes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1007**, 349-356, doi: 10.1196/annals.1286.034.
77. Docampo-Seara, A., Santos-Durán, G. N., Candal, E., Ángel, M., and Díaz, R. (2019) Expression of radial glial markers (GFAP, BLBP and GS) during telencephalic development in the catshark (*Scyliorhinus canicula*), *Brain Struct. Funct.*, **224**, 33-56, doi: 10.1007/s00429-018-1758-2.
78. Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., et al. (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of

- developing mouse spinal cord, *J. Neurosci.*, **17**, 9212-9219, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09212.1997.
79. Belozor, O. S., Yakovleva, D. A., Potapenko, I. V., Shuvaev, A. N., Smolnikova, M. V., et al. (2019) Extracellular S100 disrupts Bergman glia morphology and synaptic transmission in cerebellar Purkinje cells, *Brain Sci.*, **9**, 80, doi: 10.3390/brainsci9040080.
 80. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Kohda, K., Yuzaki, M., et al. (2017) Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7438-7443, doi: 10.1073/pnas.1617330114.
 81. Tiburcio-Félix, R., Escalante-López, M., López-Bayghen, B., Martínez, D., Hernández-Kelly, L. C., et al. (2018) Glutamate-dependent translational control of glutamine synthetase in Bergmann glia cells, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 5202-5209, doi: 10.1007/s12035-017-0756-3.
 82. Kommata, V., and Dermon, C. R. (2018) Transient vimentin expression during the embryonic development of the chicken cerebellum, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **65**, 11-20, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.10.003.
 83. Pow, D. V., and Barnett, N. L. (1999) Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Müller cell glutamate transporter GLAST, *Cell Tissue Res.*, **297**, 57-66, doi: 10.1007/s004410051333.
 84. Yu, J., Zhong, Y., Cheng, Y., Shen, X., Wang, J., et al. (2011) Effect of high hydrostatic pressure on the expression of glutamine synthetase in rat retinal Müller cells cultured *in vitro*, *Exp. Ther. Med.*, **2**, 513-516, doi: 10.3892/etm.2011.239.
 85. Voulgaris, D., Nikolakopoulou, P., and Herland, A. (2022) Generation of human iPSC-derived astrocytes with a mature star-shaped phenotype for CNS modeling, *Stem Cell Rev. Rep.*, doi: 10.1007/s12015-022-10376-2.
 86. Verkhatsky, A., Marutle, A., Rodríguez-Arellano, J. J., and Nordberg, A. (2015) Glial asthenia and functional paralysis: a new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's disease, *Neuroscientist*, **21**, 552-568, doi: 10.1177/1073858414547132.
 87. Choi, S. R., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Kwon, S. G., Choi, H. S., et al. (2016) Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice, *Neuropharmacology*, **111**, 34-46, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.027.
 88. Çavdar, S., Köse, B., Sur-Erdem, İ., and Özkan, M. (2021) Comparing astrocytic gap junction of genetic absence epileptic rats with control rats: an experimental study, *Brain Struct. Funct.*, **226**, 2113-2123, doi: 10.1007/s00429-021-02310-y.
 89. Sandoval, M., Luarte, A., Herrera-Molina, R., Varas-Godoy, M., Santibáñez, M., et al. (2013) The glycolytic enzyme aldolase C is up-regulated in rat forebrain microsomes and in the cerebrospinal fluid after repetitive fluoxetine treatment, *Brain Res.*, **1520**, 1-14, doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.049.
 90. Flügge, G., Araya-Callis, C., Garea-Rodríguez, E., Stadelmann-Nessler, C., and Fuchs, E. (2014) NDRG2 as a marker protein for brain astrocytes, *Cell Tissue Res.*, **357**, 31-41, doi: 10.1007/s00441-014-1837-5.
 91. Desilva, T. M., Billiards, S. S., Borenstein, N. S., Trachtenberg, F. L., Volpe, J. J., et al. (2008) Glutamate transporter EAAT2 expression is up-regulated in reactive astrocytes in human periventricular leukomalacia, *J. Comp. Neurol.*, **508**, 238-248, doi: 10.1002/cne.21667.
 92. Xin, W., Mironova, Y. A., Shen, H., Marino, R. A. M., Waisman, A., et al. (2019) Oligodendrocytes support neuronal glutamatergic transmission via expression of glutamine synthetase, *Cell Rep.*, **27**, 2262-2271.e5, doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.094.
 93. Winchenbach, J., Düking, T., Berghoff, S. A., Stumpf, S. K., Hülsmann, S., et al. (2016) Inducible targeting of CNS astrocytes in Aldh111-CreERT2 BAC transgenic mice, *F1000Res.*, **5**, 2934, doi: 10.12688/f1000research.10509.1.
 94. Tuohy, T. M. F., Wallingford, N., Liu, Y., Chan, F. H., Rizvi, T., et al. (2004) CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination, *Glia*, **47**, 335-345, doi: 10.1002/glia.20042.
 95. Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J. M., Consiglio, A., Delgado, A. C., et al. (2014) MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin, *Nat. Cell. Biol.*, **16**, 629-638, doi: 10.1038/ncb2993.
 96. Akanuma, S., Sakurai, T., Tachikawa, M., Kubo, Y., and Hosoya, K. (2015) Transporter-mediated L-glutamate elimination from cerebrospinal fluid: possible involvement of excitatory amino acid transporters expressed in ependymal cells and choroid plexus epithelial cells, *Fluids Barriers CNS*, **12**, 11, doi: 10.1186/s12987-015-0006-x.
 97. Trillo-Contreras, J. L., Toledo-Aral, J. J., Echevarría, M., and Villadiego, J. (2019) AQP1 and AQP4 contribution to cerebrospinal fluid homeostasis, *Cells*, **8**, 197, doi: 10.3390/cells8020197.
 98. Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Burda, J. E., Bernstein, A. M., et al. (2017) Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury, *Sci. Rep.*, **7**, 41122, doi: 10.1038/srep41122.
 99. Garaschuk, O., Milos, R. I., and Konnerth, A. (2006) Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging *in vivo*, *Nat. Protoc.*, **1**, 380-386, doi: 10.1038/nprot.2006.58.
 100. Hideharu, H., and Haruo, M. (1994) Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **31**, 1-10, doi: 10.1016/1056-8719(94)90023-X.
 101. Benediktsson, A. M., Schachtele, S. J., Green, S. H., and Dailey, M. E. (2005) Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 41-53, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.
 102. Gan, W.-B., Grutzendler, J., Wong, W. T., Wong, R. O. L., and Lichtman, J. W. (2000) Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using

- lipophilic dye combinations, *Neuron*, **27**, 219-225, doi: 10.1016/S0896-6273(00)00031-3.
103. Nimmerjahn, A., and Helmchen, F. (2012) *In vivo* labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101), *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2012**, 326-334, doi: 10.1101/pdb.prot068155.
104. Schnell, C., Hagos, Y., and Hülsmann, S. (2012) Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes, *PLoS One*, **7**, e49398, doi: 10.1371/journal.pone.0049398.
105. Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., and Rose, C. R. (2008) Developmental profile and properties of sulforhodamine 101 – labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus, *J. Neurosci. Methods*, **169**, 84-92, doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.11.022.
106. Hagos, L., and Hülsmann, S. (2016) Unspecific labelling of oligodendrocytes by sulforhodamine 101 depends on astrocytic uptake via the thyroid hormone transporter OATP1C1 (SLCO1C1), *Neurosci. Lett.*, **631**, 13-18, doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.010.
107. Dieck, S. T., Heuer, H., Ehrchen, J., Otto, C., and Bauer, K. (1999) The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes, *Glia*, **25**, 10-20, doi: 10.1002/(sici)1098-1136(19990101)25:1<10::aid-glia2>3.0.co;2-y.
108. Preston, A. N., Farr, J. D., O'Neill, B. K., Thompson, K. K., Tsirka, S. E., et al. (2018) Visualizing the brain's astrocytes with diverse chemical scaffolds, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1493-1498, doi: 10.1021/acscchembio.8b00391.
109. Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S., et al. (2003) A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes, *Neurosci. Res.*, **47**, 451-454, doi: 10.1016/j.neures.2003.08.008.
110. Vives, V., Alonso, G., Solal, A. C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice, *J. Comp. Neurol.*, **457**, 404-419, doi: 10.1002/cne.10552.
111. Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., et al. (2005) Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice, *Mol. Cell. Neurosci.*, **30**, 291-303, doi: 10.1016/j.mcn.2005.08.011.
112. Nowotschin, S., Eakin, G. S., and Hadjantonakis, A.-K. (2009) Live-imaging fluorescent proteins in mouse embryos: multi-dimensional, multi-spectral perspectives, *Trends Biotechnol.*, **27**, 266-276, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.006.
113. Kanemaru, K. (2016) Visualization of astrocytic calcium signals in fine process using an ultrasensitive calcium indicator YC-Nano50, *Folia Pharmacol. Japonica*, **147**, 190-193, doi: 10.1254/fpj.147.190.
114. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., et al. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, **388**, 882-887, doi: 10.1038/42264.
115. Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., et al. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J. Neurosci.*, **32**, 13819-13840, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
116. Akerboom, J., Carreras Calderón, N., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., et al. (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics, *Front. Mol. Neurosci.*, **6**, 2, doi: 10.3389/fnmol.2013.00002.
117. Tallin, Y. N. (2006) Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4753-4758, doi: 10.1073/pnas.0509378103.
118. Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., et al. (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nat. Methods*, **6**, 875-881, doi: 10.1038/nmeth.1398.
119. Akerboom, J. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J. Neurosci.*, **32**, 13819-13840, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012.
120. Schulze, W., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Nakazawa, T., Nagayasu, K., et al. (2015) Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **459**, 81-86, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.073.
121. John Lin, C.-C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.-W., Lee, H. K., et al. (2017) Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs, *Nat. Neurosci.*, **20**, 396-405, doi: 10.1038/nn.4493.
122. Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., et al. (2020) Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution, *Nat. Commun.*, **11**, 1220, doi: 10.1038/s41467-019-14198-8.
123. Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., He, W., et al. (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex, *J. Neuroscience*, **27**, 12255-12266, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007.
124. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., et al. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis, *Cell*, **120**, 421-433, doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
125. Ijja Boor, P. K., de Groot, K., Waisfisz, Q., Kamphorst, W., Oudejans, C. B. M., et al. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**, 412-419, doi: 10.1093/jnen/64.5.412.
126. Kinboshi, M., Shimizu, S., Mashimo, T., Serikawa, T., Ito, H., et al. (2019) Down-regulation of astrocytic Kir4.1 Channels during the audiogenic epileptogenesis in leucine-rich glioma-inactivated 1 (Lgi1) mutant rats, *IJMS*, **20**, 1013, doi: 10.3390/ijms20051013.

127. Chiou, B., Gao, C., Giera, S., Folts, C. J., Kishore, P., et al. (2021) Cell type-specific evaluation of ADGRG1/GPR56 function in developmental central nervous system myelination, *Glia*, **69**, 413-423, doi: 10.1002/glia.23906.
128. Gould, P., and Kamnasaran, D. (2011) Immunohistochemical analyses of NPAS3 expression in the developing human fetal brain, *Anat. Histol. Embryol.*, **40**, 196-203, doi: 10.1111/j.1439-0264.2010.01059.x.
129. Kamnasaran, D., Muir, W. J., Ferguson-Smith, M. A., and Cox, D. W. (2003) Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia, *J. Med. Genet.*, **40**, 325-332, doi: 10.1136/jmg.40.5.325.
130. Pieper, A. A., Wu, X., Han, T. W., Estill, S. J., Dang, Q., et al. (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14052-14057, doi: 10.1073/pnas.0506713102.
131. Linde, K., Aunin, E., Meijer, D., and Bermingham, J. R. (2013) LGI proteins in the nervous system, *ASN Neuro*, **5**, 167-181, doi: 10.1042/AN20120095.
132. Bai, Y., Du, L., Shen, L., Zhang, Y., and Zhang, L. (2009) GPR56 is highly expressed in neural stem cells but downregulated during differentiation, *Neuroreport*, **20**, 918-922, doi: 10.1097/WNR.0b013e32832c92d7.
133. Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., et al. (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex, *J. Neurosci.*, **34**, 11929-11947, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
134. Giera, S., Luo, R., Ying, Y., Ackerman, S. D., Jeong, S. J., et al. (2018) Microglial transglutaminase-2 drives myelination and myelin repair via GPR56/ADGRG1 in oligodendrocyte precursor cells, *ELife*, **7**, e33385, doi: 10.7554/eLife.33385.
135. Li, T., Chiou, B., Gilman, C. K., Luo, R., Koshi, T., et al. (2020) A splicing isoform of GPR56 mediates microglial synaptic refinement via phosphatidylserine binding, *EMBO J.*, **39**, e104136, doi: 10.15252/embj.2019104136.
136. Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., and Stevens, B. (2015) Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat. Neurosci.*, **18**, 1539-1545, doi: 10.1038/nn.4142.
137. Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., et al. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways, *Nature*, **504**, 394-400, doi: 10.1038/nature12776.
138. Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., et al. (2016) Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse, *Neuron*, **89**, 37-53, doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.
139. Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T. N., Kim, T. K., Jarsky, T., et al. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics, *Nat. Neurosci.*, **19**, 335-346, doi: 10.1038/nn.4216.
140. Bang, J., Kim, H. Y., and Lee, H. (2016) Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters, *Exp. Neurobiol.*, **25**, 205-221, doi: 10.5607/en.2016.25.5.205.
141. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
142. Bekar, L. K., and Walz, W. (1999) Evidence for chloride ions as intracellular messenger substances in astrocytes, *J. Neurophysiol.*, **82**, 248-254, doi: 10.1152/jn.1999.82.1.248.
143. El-Gaby, M., Zhang, Y., Wolf, K., Schwiening, C. J., Paulsen, O., et al. (2016) Archaelhodopsin selectively and reversibly silences synaptic transmission through altered pH, *Cell Rep.*, **16**, 2259, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.057.
144. Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., Ramírez-Franco, J., Martín-Fernández, M., Navarrete, M., et al. (2019) Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks, *Glia*, **67**, 915-934, doi: 10.1002/glia.23580.
145. Van Den Herrewegen, Y., Sanderson, T. M., Sahu, S., De Bundel, D., Bortolotto, Z. A., et al. (2021) Side-by-side comparison of the effects of Gq- and Gi-DREADD-mediated astrocyte modulation on intracellular calcium dynamics and synaptic plasticity in the hippocampal CA1, *Mol. Brain.*, **14**, 144, doi: 10.1186/s13041-021-00856-w.
146. Nam, M. H., Won, W., Han, K. S., and Lee, C. J. (2021) Signaling mechanisms of μ -opioid receptor (MOR) in the hippocampus: disinhibition versus astrocytic glutamate regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 415-426, doi: 10.1007/s00018-020-03595-8.
147. Gerasimov, E., Erofeev, A., Borodinova, A., Bolshakova, A., Balaban, P., et al. (2021) Optogenetic activation of astrocytes-effects on neuronal network function, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9613, doi: 10.3390/ijms22179613.
148. Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieger, F., and Audinat, E. (2017) An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation, *Sci Rep.*, **7**, 11280, doi: 10.1038/s41598-017-11793-x.
149. Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., et al. (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system, *Cell Rep.*, **2**, 397-406, doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.011.
150. Balachandar, L., Montejo, K. A., Castano, E., Perez, M., Moncion, C., et al. (2020) Simultaneous Ca^{2+} imaging and optogenetic stimulation of cortical astrocytes in adult murine brain slices, *Curr. Protoc. Neurosci.*, **94**, e110, doi: 10.1002/cpns.110.
151. Ryczko, D., Hanini-Daoud, M., Condamine, S., Bréant, B. J. B., Fougère, M., et al. (2021) S100 β -mediated astroglial control of firing and input processing in layer 5 pyramidal neurons of the mouse

- visual cortex, *J. Physiol.*, **599**, 677-707, doi: 10.1113/JP280501.
152. Shuvaev, A. N., Belozor, O. S., Mozhei, O., Yakovleva D. A., Potapenko, I. V., et al. (2021) Chronic optogenetic stimulation of Bergman glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1, *Neurobiol. Dis.*, **154**, 105340, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105340.
153. Iwai, Y., Ozawa, K., Yahagi, K., Mishima, T., Akther, S., et al. (2021) Transient astrocytic Gq signaling underlies remote memory enhancement, *Front. Neural Circuits*, **15**, 658343, doi: 10.3389/fncir.2021.658343.
154. Takata, N., Sugiura, Y., Yoshida, K., Koizumi, M., Hiroshi, N., et al. (2018) Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with oxygen consumption without neuronal activity modulation, *Glia*, **66**, 2013-2023, doi: 10.1002/glia.23454.
155. Moshkforoush, A., Lakshmini B., Moncion C., Montejo K. A., and Riera, J. (2021) Unraveling ChR2-driven stochastic Ca²⁺ dynamics in astrocytes: a call for new interventional paradigms, *PLoS Comput. Biol.*, **17**, e1008648, doi: 10.1371/journal.pcbi.1008648.
156. Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., et al. (2017) Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury, *Nat. Med.*, **23**, 818-828, doi: 10.1038/nm.4354.
157. Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., and Yao, W. (2019) An update on reactive astrocytes in chronic pain, *J. Neuroinflammation*, **16**, 140, doi: 10.1186/s12974-019-1524-2.
158. Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, *Nature*, **541**, 481-487, doi: 10.1038/nature21029.
159. Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., et al. (2013) Phenotypic Polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes, *J. Immunol.*, **191**, 5204-5219, doi: 10.4049/jimmunol.1301637.
160. Lee, S., Jha, M. K., and Suk, K. (2015) Lipocalin-2 in THE Inflammatory activation of brain astrocytes, *Crit. Rev. Immunol.*, **35**, 77-84, doi: 10.1615/CritRevImmunol.2015012127.
161. Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing, *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 421-433, doi: 10.1038/nrg3965.
162. Bartel, D. P., and Chen, C.-Z. (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs, *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 396-400, doi: 10.1038/nrg1328.
163. Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., et al. (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection, *Cell Res.*, **24**, 766-769, doi: 10.1038/cr.2014.44.
164. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., et al. (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication, *PLoS Biol.*, **11**, e1001604, doi: 10.1371/journal.pbio.1001604.
165. Luo, X., Jean-Toussaint, R., Sacan, A., and Ajit, S. K. (2021) Differential RNA packaging into small extracellular vesicles by neurons and astrocytes, *Cell. Commun. Signal.*, **19**, 75, doi: 10.1186/s12964-021-00757-4.
166. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., et al. (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions, *Nat. Neurosci.*, **24**, 312-325, doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
167. Pekny, M., and Pekna, M. (2016) Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 483-491, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.014.
168. Gangisetty, O, Cabrera, M. A., and Murugan, S. (2018) Impact of epigenetics in aging and age related neurodegenerative diseases, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **23**, 1445-1464, doi: 10.2741/4654.
169. Zumkehr, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Medeiros, R., and Kitazawa, M. (2018) Inflammatory cytokine, IL-1 β , regulates glial glutamate transporter via microRNA-181a *in vitro*, *J. Alzheimer's Dis.*, **63**, 965-975, doi: 10.3233/JAD-170828.
170. Guedes, J. R., Custódia, C. M., Silva, R. J., de Almeida, L. P., Pedroso de Lima, M. C., et al. (2014) Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 6286-6301, doi: 10.1093/hmg/ddu348.
171. Chu, Y. Y., Ko, C. Y., Wang, W. J., Wang, S. M., Gean, P. W., et al. (2016) Astrocytic CCAAT/enhancer binding protein δ regulates neuronal viability and spatial learning ability via miR-135a, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4173-4188, doi: 10.1007/s12035-015-9359-z.
172. Cressatti, M., Song, W., Turk, A. Z., Garabed, L. R., Benchaya, J. A., et al. (2019) Glial HMOX1 expression promotes central and peripheral α -synuclein dysregulation and pathogenicity in parkinsonian mice, *Glia*, **67**, 1730-1744, doi: 10.1002/glia.23645.
173. Varcianna, A., Myszczyńska, M. A., Castelli, L. M., O'Neill, B., Kim, Y., et al. (2019) Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS, *EBioMedicine*, **40**, 626-635, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.067.
174. Hoye, M. L., Regan, M. R., Jensen, L. A., Lake, A. M., Reddy, L. V., et al. (2018) Motor neuron-derived microRNAs cause astrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, **141**, 2561-2575, doi: 10.1093/brain/awy182.

ASTROCYTE ACTIVATION MARKERS**Review**

**Y. V. Gorina^{1,2*}, A. B. Salmina^{1,2,3}, A. I. Erofeev¹, E. I. Gerasimov¹, A. V. Bolshakova¹,
P. M. Balaban^{1,4}, I. B. Bezprozvanny^{1,5}, and O. L. Vlasova¹**

¹ *Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
194021 St. Petersburg, Russia*

² *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky,
660022 Krasnoyarsk, Russia; e-mail: yana_20@bk.ru*

³ *Laboratory of Neurobiology and Tissue Engineering,
Brain Institute, Research Center of Neurology, 105064 Moscow, Russia*

⁴ *Laboratory of Cellular Neurobiology of Learning, Institute of Higher Nervous Activity,
117485 Moscow, Russia*

⁵ *Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center,
75390 Dallas, USA*

Astrocytes are the most common type of glial cells that provide homeostasis and protection of the central nervous system. Important specific characteristic of astrocytes is the manifestation of morphological heterogeneity, which is directly dependent on the localization in a particular area of the brain. Astrocytes can integrate into neural networks and keep neurons active in various areas of the brain. Moreover, astrocytes express a variety of receptors, channels, and membrane transporters, which underlie their peculiar metabolic activity, which determines the plasticity of the central nervous system during development and aging. Such a complex structural and functional organization of astrocytes determines the use of modern methods for their identification and analysis. Considering the important fact that determining the most appropriate marker for polymorphic and multiple subgroups of astrocytes is of decisive importance for the study of their multifunctionality, this review presents markers, modern imaging techniques and identification of astrocytes. It represents a valuable resource for studying the structural and functional properties of astrocytes, as well as better understanding the extent to which astrocytes contribute to neuronal activity.

Keywords: astrocytes, markers, imaging methods, miRNA, optogenetics

ОПЕЧАТКИ, ЗАМЕЧЕННЫЕ В «БИОХИМИИ», том 87, вып. 2, 2022

DOI: 10.31857/S0320972522070120, EDN: AWIRUC

Страница	Столбец	Строка	Напечатано	Следует читать
251	правый	раздел «Финансирование»	Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-51015. Гусев Ф.Е. (описание эпигенетических подходов) был поддержан Научно-технологическим университетом «Сириус».	Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-51015. Анализ методов глубокого секвенирования проведен в рамках научного проекта РФФИ № 19-75-30039 (Ф.Е. Гусев).
258	—	даты доработки и принятия статьи к публикации	После доработки 08.01.2022 Принята к публикации 21.01.2022	После доработки 23.12.2021 Принята к публикации 23.12.2021

АНОНС

В 2022 году готовятся к печати специальные выпуски «Биохимии»:

Том 87, выпуск 8. Посвящен памяти профессора А.Д. Виноградова, специалиста в области биохимии митохондрий, биоэнергетики и энзимологии. В номере, приуроченном к его 80-летию, будут представлены экспериментальные и обзорные статьи его коллег и учеников из разных стран.

Том 87, выпуск 10 (под ред. А.Ю. Семёнова и А.А. Красновского). Посвящен памяти академика В.А. Шувалова, специалиста в обла-

сти фотосинтеза. В номере будут представлены экспериментальные и обзорные статьи его коллег и учеников из разных стран.

Том 87, выпуск 12 (под ред. Б.В. Черняка и А.М. Оловникова). Посвящен 25-летию термина «феноптоз», впервые сформулированного главным редактором «Биохимии» академиком В.П. Скулачевым. В номере будут представлены экспериментальные и обзорные статьи ученых, работающих в области геронтологии, биоэнергетики, окислительного фосфорилирования и др.