## СОДЕРЖАНИЕ

#### Том 85, выпуск 1, 2020

Особенности микробиома респираторного тракта больных муковисцидозом О.Л. Воронина, Н.Н. Рыжова, М.С. Кунда, Э.В. Лосева, Е.И. Аксенова, Е.Л. Амелина, Г.Л. Шумкова, О.И. Симонова, А.Л. Гинцбург	3
Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины (обзор) П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко, В.А. Ткачук	15
Регуляция малатдегидрогеназ и глутаматдегидрогеназы мозга животных тиамином in vitro и in vivo	
О.А. Меженская, В.А. Алешин, Т. Кэне, А.В. Артюхов, В.И. Буник	34
Внутриклеточные механизмы чувствительности к кислороду (обзор) <i>А.Н. Вётош</i>	49
Транскрипционный фактор KLF2 и его роль в регуляции воспалительных процессов (обзор) <i>К.Т. Турпаев</i>	64
Методы вычислительной интерактомики в вопросах взаимодействия протеоформ человека (обзор) <i>Е.В. Поверенная, О.И. Киселева, А.С. Иванов, Е.А. Пономаренко</i>	80
Шаперонная и иммуноглобулинсвязывающая активности Skp из Yersinia pseudotuberculosis Е.В. Сидорин, В.А. Хоменко, Н.Ю. Ким, Т.Ф. Соловьева	93
Проверка подхода к созданию стабильных форм белков, основанного на предсказании нативно-развернутых участков, на примере рибосомных белков L1 Г.С. Нагибина, В.В. Марченков, К.А. Глухова, Т.Н. Мельник, Б.С. Мельник	104
	104
Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека Д.К. Нилов, С.В. Пушкарев, И.В. Гущина, Г.А. Манасарян, К.И. Кирсанов, В.К. Швядас	116
Снижение уровня мРНК гена <i>PTPN11</i> препятствует изменению экспрессии генов, контролирующих клеточный цикл, устойчивость к химиотерапии и онкоген-индуцируемое клеточное старение, в ответ на экспрессию онкогена BRAF V600E в клетках щитовидной железы человека	
л.В. Путляева, Д.Э. Демин, А.Н. Уварова, Л.С. Зиневич, М.М. Прокофьева, Г.Р. Газизова, Е.И. Шагимарданова, А.М. Шварц	126
Этанольный экстракт оболочки семян тамаринда эффективно защищает эритроциты от эриптоза, вызванного окислительным стрессом	
Дж. Кенгайя, С.К.М. Нандиш, Ч. Рамачандрайя, Чандрама, А. Шивайя, Дж.Дж. Вишалакши, М. Поль, С.М. Сантош, Р.Л. Шанкар, Д. Саннанингайя	139

## **CONTENTS**

#### Vol. 85, Publ. 1, 2020

УДК 579.61

## ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ\*

© 2020 О.Л. Воронина<sup>1\*\*,\*\*\*</sup>, Н.Н. Рыжова<sup>1</sup>, М.С. Кунда<sup>1</sup>, Э.В. Лосева<sup>1</sup>, Е.И. Аксенова<sup>1</sup>, Е.Л. Амелина<sup>2</sup>, Г.Л. Шумкова<sup>2</sup>, О.И. Симонова<sup>3</sup>, А.Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: olv550@gmail.com

Поступила в редакцию 04.06.2019 После доработки 29.07.2019 Принята к публикации 10.09.2019

Микробиота — неотъемлемая часть организма человека, которую активно исследуют, в т.ч. методами массового параллельного секвенирования. Однако микробиомы легких и пазух носа стали объектами пристального внимания лишь в последнем десятилетии. Для пациентов с муковисцидозом контроль состояния микроорганизмов дыхательных путей важен для сохранения функции легких. Выяснение роли пазух носа и наличия полипов в формировании микробиома дыхательных путей стало целью нашего исследования. Мы показали, что уже в детском возрасте в пазухах носа присутствуют протеобактерии, обнаруженные также в образцах из нижних дыхательных путей. В ряде случаев им сопутствуют потенциально опасные базидиомицеты. Однако наличие полипов не влияет на формирование микробиома пазух носа. Протеобактерии являются определяющими в снижении биоразнообразия микробиомов легких и пазух носа, что коррелирует с ухудшением показателей функции легких. Мягкие мутации в гене *CFTR* даже в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией I класса способствуют формированию более благополучного микробиома.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** микробиом, муковисцидоз, респираторный тракт, хронический риносинусит, Proteobacteria.

DOI: 10.31857/S0320972520010017

Микробиоту — совокупность микроорганизмов — в настоящее время рассматривают как неотъемлемую составную часть организма человека, оказывающую влияние на пищеварительную, иммунную, нервную и др. системы. XXI век привнес новый термин — микробиом, определяющий суммарный геном микроорганизмов экологической ниши или конкретного образца. Однако в большинстве исследований под микробиомом понимают совокупность генов рибосомальной РНК (рРНК) микробиоты.

Woese et al. доказали универсальность этих генов и возможность рассмотрения их как мо-

лекулярных часов для филогенетики [1]. Особое внимание Stackebrandt и Woese уделяли роли рРНК в филогении и таксономии прокариот [2]. В 1970-е гг. началось накопление данных о последовательностях генов рРНК, чему содействовали работы Sanger, предложившего в 1977 г. метод расшифровки первичной структуры ДНК. Накопленные данные нуждались в систематизации, и в 1982 г. GenBank NCBI начал работу в качестве базы данных последовательностей нуклеиновых кислот [3]. В 1990-е гг. Woese et al. выполнили проекты по формированию базы данных последовательностей рРНК [4]. Пере-

Принятые сокращения: МВ — муковисцидоз; СFTR — трансмембранный регулятор проводимости (cystic fibrosis transmembrane regulator); МLST — мультилокусное секвенирование (MultiLocus Sequence Typing); ST — генотип в контексте генов MLST (Sequence Type); ITS — внутренний транскрибируемый спейсер (internal transcribed spacer); ОТU — операционная таксономическая единица (Operational Taxonomic Unit); SRA — Архив секвенированных прочтений (Sequence Read Archive); PCoA — анализ главных координат (Principal Coordinate Analysis); ОФВ1 — объем форсированного выдоха в первую секунду; PERMANOVA — пермутационный многомерный анализ дисперсии (PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance); FDR — доля ложных отклонений (false discovery rate).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, 115682 Москва, Россия

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, 119296 Москва, Россия

<sup>\*</sup> Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

<sup>\*\*</sup> Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

<sup>\*\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

численные события содействовали тому, что дальнейшая автоматизация процесса секвенирования нуклеиновых кислот, разработка секвенаторов нового поколения, обеспечивших получение большого массива данных, не привели к хаосу, а позволили пополнить созданные базы новой информацией. Поскольку биология в XX веке, по меткому выражению Woese, стала инженерной наукой [1], процессы компьютеризации затронули ее в полной мере. Разработанное и постоянно совершенствуемое программное обеспечение, развитие компьютерной техники позволяют анализировать результаты секвенирования и сопоставлять их с базами данных.

Подготовленная информационная среда и опыт секвенирования, полученный в процессе выполнения проекта «Геном человека», позволили в 2008 г. запустить новый проект «Микробиом человека» (The Human Microbiome Project, HMP) [5]. В процессе оптимизации исследования основной мишенью для секвенирования был выбран ген 16S rDNA, а в дальнейшем – его фрагмент, включающий несколько вариабельных областей (как правило, V1-V4 или меньше, в зависимости от возможностей платформы, применяемой для секвенирования). Таким образом, исследование микробиома в контексте фрагментов генов 16S rDNA, строго говоря, позволяет получить представление о бактериоме, т.е. о филогенетическом разнообразии бактерий.

Метагеномные исследования, предоставляющие возможность изучить метаболизм микробного сообщества, пока дороги и могут быть выполнены только в рамках отдельных высокофинансируемых проектов.

Следует отметить, что первый проект «Микробиом человека» был нацелен на исследование бактерий кишечника, кожи, урогенитального тракта и, исходя из господствовавших представлений о стерильности легких, не включал эту область в поле зрения своих интересов [5, 6]. Только к следующему проекту «Интегративный геном человека» (The Integrative Human Microbiome Project, iHMP), начавшемуся в 2014 г., это предубеждение удалось преодолеть [5]. Таким образом, активное изучение микробиома легких и ряда отделов верхних дыхательных путей в норме и при патологиях с применением методов массового параллельного секвенирования началось только в 10-е гг. XXI века.

В норме формирование микробиома легких определяют два основных процесса: аспирация микроорганизмов ротовой полости и мукоцилиарный клиренс, удаляющий большинство «пришельцев» из нижних дыхательных путей. Так

формируется сбалансированное сообщество, находящееся под контролем клеток иммунной системы, способных уничтожить патогенные микробы, благодаря работе фаголизосомы.

При моногенном заболевании муковисцидоз (МВ) мутации в гене трансмембранного регулятора проводимости (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) приводят к нарушению транспорта ионов хлора, последствиями которого являются мультиорганные поражения. В центре внимания врачей, прежде всего, находится состояние нижних дыхательных путей пациентов с МВ, поскольку снижение функции легких сказывается на качестве жизни пациентов и определяет продолжительность жизни.

Следует отметить, что при повреждении хлорного канала нарушается мукоцилиарный клиренс не только в легких, бронхах, трахее, но и в полостях носа, в т.ч. в пазухах. Секрет становится все более плотным, создавая препятствие для работы реснитчатого эпителия. Накапливаются микроорганизмы, их атакуют клетки иммунной системы, но не могут уничтожить, поскольку нарушение работы хлорного канала не позволяет должным образом закислить полость фаголизосомы. В ответ на сигналы макрофагов приходят нейтрофилы, у которых также не работает хлорный канал. Некроз клеток иммунной системы способствует формированию дезинтегрированного воспалительного процесса при хронической инфекции, обусловленной размножающимися микроорганизмами [7].

Изменения в составе микробиома у больных МВ начинаются с ранних лет [8], выявить триггер этих изменений позволят последовательные исследования микробиома пациентов в течение всей их жизни. Накопленные в настоящий момент знания сформировали представление о так называемом «здоровом микробиоме» нижних дыхательных путей, в который входят представители трех основных филумов: Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes [9]. Несмотря на то что протеобактерии присутствуют в сбалансированном микробиоме здоровых людей [10], их появление в микробном сообществе легких больных МВ является настораживающим фактором, поэтому протеобактерии, прежде всего, подлежат регулярному контролю в нижних дыхательных путях пациентов с МВ. Данные о пациентах с хронической инфекцией легких отражаются в национальном и международных регистрах больных МВ [11, 12].

При сопоставлении микробиомов легких здоровых добровольцев и пациентов с МВ в первую очередь необходимо обратить внимание на такой параметр, как бактериальная нагрузка.

Она низка у здоровых людей в течение всей жизни и у детей с МВ в раннем возрасте. Начало изменений в микробиоме пациентов с МВ, выражающееся в увеличении бактериальной нагрузки, росте количества протеобактерий и снижении разнообразия микробного сообщества, зависит от многих параметров, ключевой из которых пока не определен [13].

Протеобактерии, попадающие в организм человека из окружающей среды, заслуживают особого внимания в отношении больных МВ. За годы наблюдений с 1950-х гг. доказано, что Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia spp., Achromobacter spp. и Stenotrophomonas maltophilia, относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам, являются патогенами при муковисцидозе [14]. При инфицировании этими микроорганизмами нижних дыхательных путей снижается функция легких, сокращается 5-летняя выживаемость [15], возникает опасность заселения этими бактериями трансплантата легких [16].

Обострения заболевания легких, антибиотикотерапия, класс мутаций в гене *CFTR* и другие факторы влияют на состояние микробиоты, сдерживание патогенных микроорганизмов и снижение функции легких [17—19].

Однако даже после успешной антибиотикотерапии протеобактерии появляются в легких вновь, причем бактерии того же генотипа, что и колонизировавшие ранее нижние дыхательные пути. Наблюдения за пациентами, инфицированными *Burkholderia* и перенесшими трансплантацию легких, показали, что в зависимости от состояния пациента и патогенных свойств бактерии *Burkholderia* прежнего генотипа заселяла новые легкие сразу после пересадки, через 3 месяца, через год и более, но через 2,5 года после операции *Burkholderia* была выявлена у всех исследованных пациентов [20].

Эти факты заставили обратить внимание на верхние дыхательные пути, а именно пазухи носа, как возможный резервуар инфекции. В пилотном исследовании мы показали, что у всех пациентов, для которых были одновременно взяты образцы лаважа пазух носа и мокроты, совпали генотипы патогенных микроорганизмов в обоих образцах [21].

Поскольку хронический риносинусит, нарушение мукоцилиарного клиренса пазух носа наблюдаются у всех пациентов с МВ, но только у доли больных разрастаются полипы назальных пазух и средней раковины, мы предприняли следующий этап исследования для выяснения роли морфологических образований носа в формировании микробиома верхних дыхательных путей и его влиянии на микробиом легких.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал. В анализе были 53 образца от 21 пациента с МВ (15 взрослых, медиана возраста 27,3 года; 6 детей, медиана возраста 8,7 лет): 22 образца мокроты, 14 образцов лаважа верхнечелюстных пазух носа, 2 назофарингеальных смыва, 8 трахеальных аспиратов и 7 фрагментов полипов, полученных во время полипэктомии. По состоянию верхних дыхательных путей отоларинголог всем пациентам поставил диагноз хронический риносинусит преимущественно тяжелого течения с полипами или без них.

Забор образцов осуществляли специалисты лечебных учреждений, в которых наблюдались пациенты. Информированные согласия на исследование образцов были получены врачами от взрослых больных МВ, пациентов старше 15 лет, а также от родителей и опекунов несовершеннолетних пациентов младше 15 лет. Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных МВ и врожденным пороком развития легких, был одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1 от 17.05.2012).

**Методы.** ДНК из образцов мокроты выделяли согласно инструкции к набору реактивов Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit на приборе Maxwell MDX Instrument («Promega», США).

Основной микроорганизм биологического образца определяли с помощью амплификации и секвенирования фрагмента гена 16S rDNA, как описано ранее Voronina et. al. [22]. Экспресс-диагностику бактерий порядка Burkholderiales, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом, выполняли согласно схеме для молекулярно-генетического типирования, предложенной Ворониной с соавт. [23]. Для выявления Pseudomonas aeruginosa использовали наиболее вариабельную мишень схемы мультилокусного секвенирования (MLST, MultiLocus Sequence Typing) trpE, следуя методике Curran et al. [24] с нашими модификациями.

Идентификацию гена *mecA* в составе стафилококковой хромосомной кассеты (staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec), определяющей устойчивость к метициллину, проводили с праймерами  $Mec_10-11_For\ 5'-ATGTAT-GCTTTGGTCTTTCT-3'$  и  $Mec_10-11_Rev\ 5'-TACACATATCGTGAGCAATGA-3'$ , разработанными нами. Для амплификации фрагмента гена *mecA* использовали следующую программу: 95 °C -10 мин; (95 °C -30 c, 52 °C -1 мин, 72 °C -1 мин)  $\times$  35; 72 °C -5 мин. В положительных образцах размер продукта амплификации составлял 584 п.н.

Выявление возбудителей микозов проводили на основе амплификации и секвенирования региона ITS1\_5.8S\_ITS2 согласно протоколу, опубликованному Ворониной с соавт. [25].

Для определения состава микробиома различных отделов респираторного тракта проводили массовое параллельное секвенирование ампликонов гена *16S rDNA* на платформе MiSeq Illumina, как описано Рыжовой с соавт. [19].

Полученные данные анализировали с помощью модуля Microbial Genomics программы CLC Genomic Workbench v.11 — 12. Для определения OTU (Operational Taxonomic Unit) использовали базу данных Greengenes v.13\_8 с уровнем сходства 97%.

Данные секвенирования депонировали в SRA (Sequence Read Archive) NCBI: BioProject accession number PRJNA544655 для микробиомов взрослых, PRJNA544933 — для микробиомов детей.

Для оценки альфа-разнообразия (таксономическое разнообразие микробиоты в конкретном образце) использовали коэффициент филогенетического разнообразия, а также Simpson's index, показатели Shannon entropy и Chao 1 biascorrected. Бета-разнообразие (степень попарного сходства таксономического состава микробиоты разных проб) было оценено с помощью индексов Jaccard, Bray-Curtis, Euclidean distance, а также различных метрик UniFrac (Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac, Weighted UniFrac, yчитывающих филогенетическую структуру сообщества [26].

Для подробного анализа сходства между образцами использовали Principal Coordinate Analysis (PCoA), основанный на многомерном рассмотрении данных [27]. Подгруппы взрослых пациентов формировали с учетом следующих параметров: 1) возраст: 18-25, 26-30 лет; 2) значение ОФВ1 (объем форсированного выдоха в первую секунду): 70-115%, 40-69%, <40%; 3) тип образца: из верхних или нижних дыхательных путей; 4) степень тяжести болезни легких: легкое течение, средней тяжести, тяжелое течение; 5) основной микроорганизм, выявленный в микробиоме (восемь групп); 6) класс мутации в гене CFTR (Cystic Fibrosis Transport Regulator). Для определения класса мутаций использовали базу данных МГНЦ LOVD v.0.1 [28].

Анализ статистической значимости различий между группами образцов производили с помощью метода PERMANOVA (PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance) [29]. Для каждой пары групп рассчитывали псевдо-f статистику, величину уровня значимости *p* и скорректированные по Бонферрони *p*-значения. Досто-

верными признавали только различия для групп с p < 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение микроорганизмов верхних и нижних дыхательных путей в группе детей с МВ. Исследования последнего десятилетия доказали необходимость контроля микроорганизмов верхних дыхательных путей у больных МВ. Однако неясно, в каком возрасте пациента опасные для функции легких микроорганизмы колонизируют верхние дыхательные пути, особенно пазухи, среднюю и верхнюю раковины носа. Получение образцов такого рода у детей затруднено болезненностью процедуры. Источником материала могут служить фрагменты полипов, удаленных при полипэктомии.

При анализе материала от пяти пациентов с МВ было показано, что у четырех детей полипы содержали *Staphylococcus aureus*, являющийся аутохтонным микроорганизмом для носовой полости. Отсутствие генов *mecA* в образцах подтвердило чувствительность *S. aureus* к метициллину, что также свидетельствовало в пользу аутохтонного происхождения выявленных бактерий. Пациент 3-СНР, у которого в полипах был выявлен только *S. aureus*, при дальнейшем наблюдении демонстрировал нормальную функцию легких и отсутствие протеобактерий в трахеальном аспирате при преобладании *Streptococcus* spp.

У четырех пациентов и в полипах, и в трахеальном аспирате выявили *P. aeruginosa*. Генотипы бактерий в нижних и верхних дыхательных путях совпали у всех пациентов. Следует отметить, что у ребенка 2-СНР с 9 до 12 лет в трахеальном аспирате из протеобактерий обнаруживали только *Achromobacter xylosoxidans* ST251, однако после его эрадикации в образцах из нижних дыхательных путей детектировали *P. aeruginosa* того же генотипа, что ранее был выявлен в полипах носа.

У близнецов 4-СНР и 5-СНР помимо одинаковых *P. aeruginosa* в полипах были обнаружены грибы *Auriculariopsis ampla* (Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Schizophyllaceae), тогда как в трахеальном аспирате обоих пациентов присутствовали дрожжеподобные грибы *Candida albicans*. В то же время даже у близнецов наблюдали отличия в микробиомах: если основным микробом полипов пациента 4-СНР был *S. aureus*, то в полипах 5-СНР преобладал *Наеторhilus influenzae*, ранее обнаруженный в образцах трахеального аспирата.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что уже в детском возрасте у пациентов с МВ верхние дыхательные пути могут служить резервуаром бактерий, инфицирующих легкие.

Сравнение альфа-разнообразия бактерий в микробиомах ребенка и взрослых с диагнозом МВ. Протеобактерии порядка Burkholderiales опасны для больных МВ способностью формировать эпидемические штаммы, распространяемые воздушно-капельным путем. Для российских пациентов наиболее значимыми являются В. сепоcepacia ST709 (Sequence Type) и A. ruhlandii ST36 [21]. При хронизации инфекции не отмечено эрадикации этих бактерий из дыхательных путей. Поэтому когда у ребенка 82-СГ в возрасте 4 г. 9 мес. была выявлена *В. сепосерасіа* ST709, врачами стационара была применена интенсивная терапия, а также проведена операция по промыванию пазух носа. Анализ лаважа пазух показал, что даже после очистки легких от буркхолдерии в пазухах носа сохранялись различные представители порядка Burkholderiales, а также другие протеобактерии. Несмотря на то что антибиотикотерапия оказала влияние на фирмикутов, индекс альфа-разнообразия (тах 12) для образцов трахеального аспирата и пазух носа пациента 82-С был достаточно высоким (рис. 1) и значительно превышал соответствующий показатель (тах 7) для образцов взрослых даже у самого благополучного пациента 61-СГ с сохранной функцией легких и чистыми пазухами носа при легкой форме хронического риносинусита.

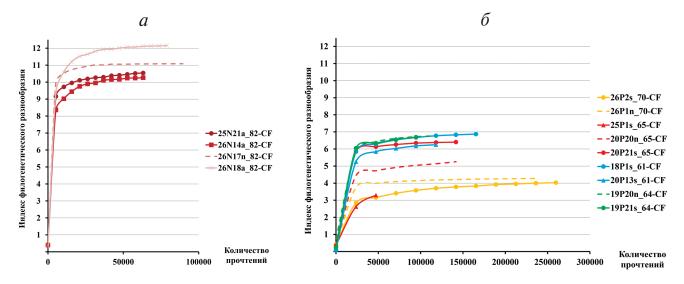
Эти данные подтверждают, что регулярные обострения и курсы антибиотикотерапии сокращают разнообразие микробиома легких пациен-

тов с МВ, что снижает способность здоровой части микробиома противостоять патогенным микроорганизмам.

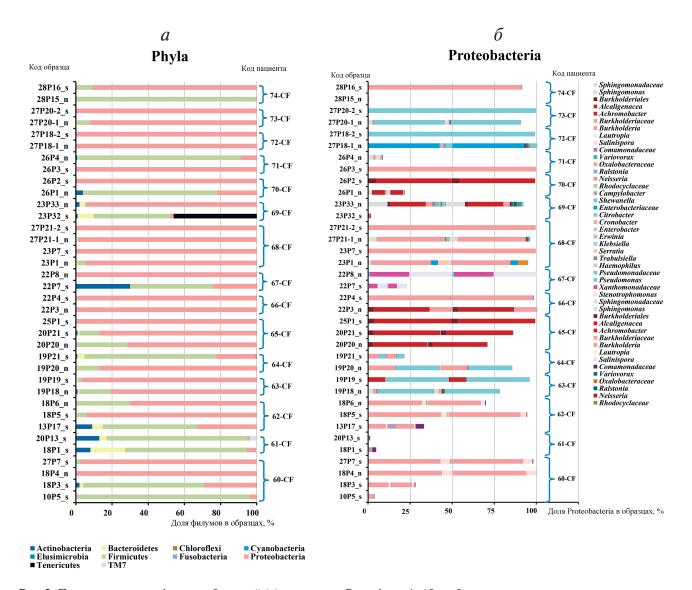
Сопоставление микробиомов пазух носа и нижних дыхательных путей у взрослых пациентов с МВ. Взрослых пациентов, вошедших в анализ микробиома респираторного тракта, можно разделить на три группы по тяжести заболевания легких: легкая форма, средняя и тяжелая. Только у одного пациента первой группы — 61-CF— отсутствовали протеобактерии в мокроте в период наблюдения. У всех остальных пациентов вне зависимости от тяжести заболевания легких в мокроте были выявлены представители родов Burkholderia, Achromobacter и Pseudomonas.

В лаваже пазух носа бактерии и грибы отсутствовали у пациента 61-СF. Лишь следы Burkholderia обнаружены у пациента 74-СF в образце лаважа пазух носа, полученного в процессе полипотомии и полисинусотомии носа (рис. 2). В образце преобладал S. aureus, тогда как в легких 90% всего микробиома составляла В. cenocepacia ST709. Объяснение такого исключения врачи видят в чрезвычайно затрудненном носовом дыхании из-за разрастания полипов.

У пациентов 70-СF и 71-СF преобладание фирмикутов в образцах из верхних дыхательных путей («п») определили проблемы взятия материала. У пациентов в силу тяжести состояния был выполнен только прокол пазух, и смыв включал не только вытекший гной, но и бактерии носоглотки, поэтому эти два образца следует считать назофарингеальными смывами, обогащенными содержимым пазух. Как видно из рис. 2, в образцах «п» этих пациентов 80—90%



**Рис. 1.** Альфа-разнообразие микробиомов в образцах пациентов с муковисцидозом. a — Образцы ребенка 82-CF: a — трахеальный аспират, n — лаваж пазух носа;  $\delta$  — образцы взрослых пациентов: s — мокрота, n — лаваж пазух носа



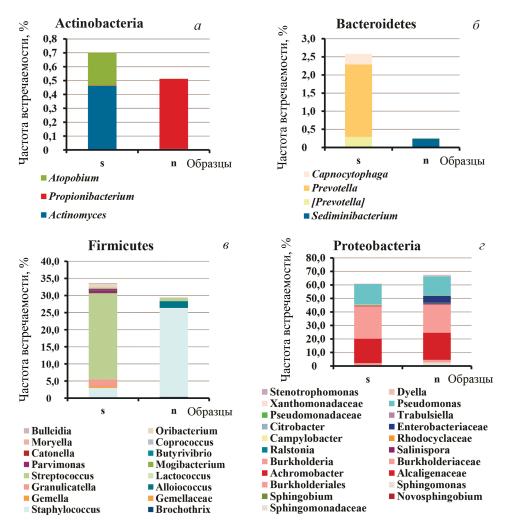
**Рис. 2.** Представленность филумов бактерий (a) и таксонов Proteobacteria ( $\delta$ ) в образцах респираторного тракта взрослых пациентов с муковисцидозом: n- лаваж верхнечелюстных пазух (для пациентов 70-CF и 71-CF — назофарингеальные смывы, обогащенные содержимым пазух), s- мокрота. Фигурными скобками объединены образцы одного пациента

всех бактерий составляли фирмикуты, однако обнаруженные протеобактерии соответствовали по генотипу выявленным в мокроте.

У остальных пациентов протеобактерии превалировали в микробиоме пазух носа даже в период благополучного состояния микробиома легких, например, у пациентов 60-CF и 64-CF.

При сравнении всех образцов мокроты со всеми образцами лаважа пазух носа достоверное отличие было получено по индексам Unweighted UniFrac (p = 0,00118) и D\_0 UniFrac (p = 0,0001) (рис. 3). Фракции фирмикутов, а также минорных актинобактерий и бактероидов отличались по составу между микробиомами пазух носа и мокроты (параметры достоверности для отмеченных на рис. 3 таксонов представлены в табли-

це). Среди фирмикутов пазух носа ожидаемо лидировали Staphylococcus, а в мокроте — Streptococcus. Бактероиды Prevotella и Capnocytophaga, представленные в микробиоме мокроты, практически отсутствовали в пазухах носа. Для филума актинобактерий в образцах мокроты были характерны Actinomyces и Atopobium, а в пазухах носа был выявлен Propionibacterium. В то же время протеобактерии, преобладавшие как в микробиоме пазух, так и в микробиоме легких, практически не отличались по составу. Дополнительный таксон в пазухах носа представляли энтеробактерии. Таким образом, мы получили еще одно подтверждение характеристики пазух носа как резервуара протеобактерий, способных поддерживать инфекцию в легких у пациентов с МВ.



**Рис. 3.** Сопоставление состава филумов Actinobacteria (a), Bacteroidetes ( $\delta$ ), Firmicutes ( $\theta$ ) и Proteobacteria ( $\epsilon$ ) в мокроте и образцах из верхних дыхательных путей взрослых пациентов с муковисцидозом: s-21 образец мокроты, n-13 образцов лаважа верхнечелюстных пазух носа и 2 назофарингеальных смыва, обогащенных содержимым пазух

Сравнение микробиомов пазух носа взрослых пациентов с МВ с полипами и без полипов. У всех взрослых пациентов, взятых в исследование, отоларингологом диагностирован хронический риносинусит. Только у пациента 61-СF отмечено легкое течение, остальные 14 пациентов характеризовались тяжелым течением риносинусита. У восьми пациентов полипы отсутствовали, у шести обнаружены полипы второй степени с обеих сторон. У пациента 68-СГ были проанализированы два образца из пазух носа: один образец был взят до, а второй - после полипо- и полисинусотомии. У пациента 72-СF лаваж пазух носа был получен через два месяца после третьей за последние 16 лет операции полипо- и полисинусотомии.

Результаты РСоА микробиомов образцов пазух носа представлены на рис. 4, a. Как видно на рисунке, группировка образцов по признаку на-

Достоверность отличий по содержанию таксонов актинобактерий, бактероидов и фирмикутов в образцах мокроты и лаважа пазух носа

p	FDR p
8,84E-09	2,43E-07
4,28E-11	2,44E-09
4,04E-11	2,41E-09
1,88E-12	2,07E-10
2,93E-11	1,99E-09
7,14E-11	3,71E-09
	8,84E-09 4,28E-11 4,04E-11 1,88E-12 2,93E-11

Примечание. FDR – false discovery rate (доля ложных отклонений).

личия/отсутствия полипов не наблюдается. Достоверно различаются микробиомы двух групп: І — с доминирующей *Burkholderia* и ІІ — с превалирующим *Pseudomonas*. Причем в группу І входят оба образца пациента 68-СF. У пациента 72-СF даже после третьей операции протеобактерии составляли 100% микробиома, среди которых лидировала *E. coli*, а *P. aeruginosa*, превалировавший в микробиоме легких, составлял < 10% (рис. 2). Таким образом, для эрадикации протеобактерий недостаточно только оперативного вмешательства, необходима длительная антибиотикотерапия посредством ингаляций и приверженность пациентов к лечению.

Сопоставление микробиомов респираторного тракта в подгруппах сравнения взрослых пациентов. Результаты РСоА всех образцов респираторного тракта (рис. 4,  $\delta$ ) выявили три достоверно отличающиеся группы по доминирующему микроорганизму. Наиболее многочисленная группа І *Burkholderia* отличалась от группы ІІ *Achromobacter* по всем восьми использованным индексам (Bray—Curtis p = 0,00016), от группы ІІІ *Pseudomonas* — по всем, кроме Euclidean (Bray—Curtis p = 0,000116). Отличие группы ІІ от группы ІІІ подкреплено восемью индексами (Bray—Curtis p = 0,00433).

Обращает на себя внимание положение образцов пациента 61-СF с самым здоровым микробиомом (наиболее удаленные точки по оси PCo3 12%). Увеличение доли фирмикутов и со-

кращение доли протеобактерий до 30% в образцах мокроты пациентов 60-CF и 62-CF в благо-получный период приводит к смещению образцов вверх по оси PCo2 19%.

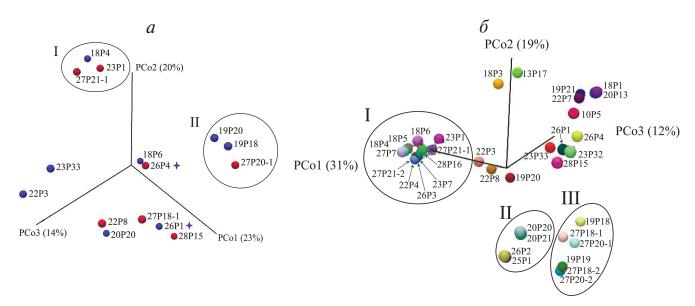
В то же время образцы лаважа пазух носа со сложным сочетанием нескольких протеобактерий выстроились вдоль оси PCo1 31%: 22P3, 22P8, 19P20, а образцы мокроты с комбинацией протеобактерий сместились по оси PCo2 19%: 19P21 и 22P7.

При сравнении микробиомов в подгруппах по ОФВ1 было получено достоверное отличие подгруппы 1 с ОФВ1 70–115% от подгруппы 3 с ОФВ1 < 40% (Bray—Curtis p = 0.00899).

Сравнение подгрупп по классам мутаций показало, что достоверные отличия наблюдаются между подгруппами Class II/Class I и Class V/ Class I (Bray—Curtis p=0.02857), а также между Class II/Class II и Class V/Class I (Euclidean p=0.02573). Эти данные подчеркивают вклад мягких мутаций (Class V) даже в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией I класса.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Персонализированная медицина, учитывающая влияние генетических особенностей и окружающей среды на состояние здоровья человека [30], не может не принимать во внимание еще один «весомый» комплекс генов — микробиом. Поскольку муковисцидоз — заболевание, затра-



**Рис. 4.** Результаты РСоА микробного разнообразия образцов взрослых пациентов с муковисцидозом. a — Образцы лаважа верхнечелюстных пазух (13 образцов) и назофарингеальных смывов (2 образца). Красные круги — образцы пациентов с полипами, синие круги — образцы пациентов без полипов. Подгруппа I — образцы с *Burkholderia*, подгруппа II — образцы с *Pseudomonas*. Звездочкой отмечены образцы назофарингеальных смывов;  $\delta$  — все образцы от взрослых пациентов. Подгруппа I — образцы с *Burkholderia*, подгруппа III — образцы с *Pseudomonas* 

гивающее многие органы и ткани, системный подход к его лечению сложился и в детских, и во взрослых Центрах муковисцидоза. Один из компонентов этого подхода — микробиологическая диагностика. Обоснованный забор образцов, выполненный под наблюдением пульмонологов и отоларингологов, пролонгированное наблюдение, учитывающее применяемую антибиотико- и физиотерапию, питание, географию перемещений пациента и др. факторы, помогают в трактовке изменений микробиома дыхательных путей пациента, что обеспечивает своевременную корректировку терапии и стабилизацию состояния больного.

Включение в наблюдение верхних дыхательных путей способствовало выявлению еще одного резервуара инфекции, а также содействовало обоснованию и активному внедрению ингаляционной терапии. Морфологические изменения в носовой полости — полипы, снижающие в т.ч. эффективность ингаляций, оказались в поле зрения отоларингологов и микробиологов.

По данным Pletcher et al., полипы носа и пазух носа выявляют более чем у 40% детей с МВ [18]. Полипотомия в детском возрасте приводит к улучшению синоназального кровотока, что опосредованно улучшает качество жизни пациента, но не гарантирует от повторного появления полипов. Пациенту 72-СF, включенному в наше исследование, полипотомию проводили трижды.

Исследование микробного состава смывов с полипов, удаленных при операции, показало, что уже в возрасте семи лет пазухи пациента с МВ инфицированы *P. aeruginosa*. В нашей небольшой выборке образцов детей этот патогенный микроорганизм встречался чаще всего. Настораживает также выявление грибов *Auriculariopsis ampla* в образцах близнецов. Это базидиомицеты семейства Schizophyllaceae. Представитель другого рода этого семейства, *Schizophyllum commune*, известен как возбудитель инфекций человека с 1950 г. В большинстве случаев *S. commune* поражал органы дыхания: в 63% регистрировали бронхолегочное заболевание, в 31% — синусит [31].

Следует отметить, что у близнецов были выявлены индивидуальные отличия в микробиомах дыхательных путей. Наблюдение за нижними дыхательными путями пациентов в течение трех лет позволило детектировать эти отличия еще до появления в микробиоме *P. aeruginosa*, тогда маркером микробиома одного из близнецов был *H. influenzae*, обнаруженный теперь в пазухах. В последних образцах трахеальных аспиратов при сходстве большинства идентифицированных

микроорганизмов преобладающие флавобактерии отличались: у 4-СНР выявлен *Capnocytophaga* spp., а у 5-СНР – *Chryseobacterium* spp.

В группе взрослых пациентов полипы отмечены у 40% больных. Сопоставление филогенетического разнообразия микробиомов пазух носа двух групп не выявило отличий между ними. Полипо- и полисинусотомия не оказала краткосрочного влияния на состав микробиома пазух носа двух прооперированных пациентов, возможно, длительная антибиотикотерапия при соблюдении пациентом рекомендаций врача будет более эффективно воздействовать на микробы пазух носа. В настоящее время мы можем констатировать, что нарушение мукоцилиарного клиренса является определяющим в развитии инфекций пазух носа.

Заметим, что у пациентов с хроническим риносинуситом, но без диагноза МВ, Biswas et al. не выявили отличий между группами с полипами и без полипов ни по филогенетическому разнообразию микробиомов, ни по маркерам воспаления [32].

Протеобактерии, как наиболее опасные патогенные микроорганизмы, у 13 из 15 взрослых пациентов были обнаружены в двух отделах дыхательных путей и совпали по генотипу. У десяти пациентов протеобактерии в пазухах носа составили 70-100% микробиома. У троих пациентов такое изобилие протеобактерий в пазухах носа отмечено даже в период сравнительного благополучия в микробиоме легких. В нашей выборке были выявлены Burkholderia, Pseudomonas и Achromobacter, их комбинации, а также Stenotrophomonas и Е. coli в сочетании с Pseudomonas. В работе Biswas et al. снижение биоразнообразия микробиома пазух отмечали в образцах с такими протеобактериями, как *Pseudo*monas, Haemophilus и Achromobacter [32].

Сопоставляя микробиомы пазух носа и легких, отметим, что у восьми из 14 взрослых пациентов мы наблюдали существенно перекрывающиеся по составу микробиомы. Однако у шести пациентов в пазухах носа были выявлены отдельные микроорганизмы, отсутствующие в легких, например, *E. coli* у пациента 72-СF. По мнению одних исследователей, Lucas et al., наличие патогенной бактерии в пазухах носа не является предиктором появления ее в легких [33]; по мнению других, Fothergill et al., в пазухах носа *Pseudomonas* приобретает адаптивные признаки, которые обеспечивают эффективную колонизацию нижних дыхательных путей [34].

Таким образом, дальнейшая колонизация легких микроорганизмами из пазух носа является лишь вопросом времени, однако правильно

выбранная стратегия лечения может стать сдерживающим фактором.

В настоящее время с появлением таргетных препаратов, позволяющих частично восстановить функцию хлорного канала, стратегию лечения определяет мутация в гене *CFTR*. В нашем исследовании показана корреляция между классом мутации и разнообразием микробного сообщества отделов респираторного тракта. Мягкая мутация (Class V) даже в сочетании с мутацией I класса улучшала состояние микробиома. Самые необычные микробиомы мы наблюдали у пациента 67-СГ с мутациями [delta]F508/P205S (Class II/Class V). В легких у этого пациента были обнаружены Actinobacteria (Rothia - 29%), Firmicutes (Lactobacillus -6%, Lactococcus -2%, Streptococcus -37%), Proteobacteria (*Pseudomonas* – 1%, Xanthomonadaceae -10, Stenotrophomonas -12%), в то время как в пазухах носа выявлены Proteobacteria (Pseudomonas -2%, Xanthomonadaceae -47%, Stenotrophomonas - 51%).

Таким образом, наши данные поддерживают концепцию микробной транслокации в дыхательных путях у пациентов с МВ, однако отвергают роль полипов в формировании состава и разнообразия микробных сообществ респираторного тракта. По всей видимости, определяющую роль играют индивидуальное состояние слизистого слоя и мукоцилиарного клиренса, а также анатомические особенности пазух носа пациентов. Отсутствие патогенных микроорганизмов в одном из сайтов респираторного тракта при их наличии в другом сайте, по всей видимости, можно считать временным

явлением, связанным с антибиотикорезистентностью патогена и примененной стратегией лечения.

Проведенное исследование показало необходимость контроля микробиома пазух носа пациентов наряду с микробиомом легких, бо́льшую информативность молекулярно-генетических методов исследования по сравнению с культуральными. Подробный пролонгированный анализ микробиомов, в т.ч. их минорных компонентов, приблизит нас к пониманию триггеров развития инфекции.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00108-18-00 на 2018 г. и на плановый период 2019 и 2020 гг. и Государственного задания № 056-00078-19-00 на 2019 г. и на плановый период 2020 и 2021 гг. для НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

**Конфликт интересов.** Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов в научной и финансовой сферах.

Соблюдение этических норм. Информированные согласия на исследование образцов были получены врачами от взрослых больных МВ, пациентов старше 15 лет, а также от родителей и опекунов несовершеннолетних пациентов младше 15 лет. Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных МВ и врожденным пороком развития легких, был одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1 от 17.05.2012).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Woese, C.R. (2004) A new biology for a new century, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 173–186, doi: 10.1128/ MMBR.68.2.173-186.2004.
- 2. Stackebrandt, E., and Woese, C.R. (1984) The phylogeny of prokaryotes, *Microbiol. Sci.*, 1, 117–122.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S.R., Nookaew, I., Leuze, M.R., Ahn, T.H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G., Wassenaar, T., Poudel, S., and Ussery, D.W. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing, *Funct. Integr. Genomics*, 15, 141–161, doi: 10.1007/s10142-015-0433-4.
- 4. Olsen, G.J., Larsen, N., and Woese, C.R. (1991) The ribosomal RNA database project, *Nucleic Acids Res.*, **19 Suppl.**, 2017–2021, doi: 10.1093/nar/19.suppl.2017.
- 5. NIH Human Microbiome Project (URL: https://hmpdacc.org/).
- Proctor, L.M. (2011) The Human Microbiome Project in 2011 and beyond, *Cell Host Microbe*, 10, 287–291, doi: 10.1016/j.chom.2011.10.001.
- Nichols, D.P., and Chmiel, J.F. (2015) Inflammation and its genesis in cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.*, 50 (Suppl. 40), S39–S56, doi: 10.1002/ppul.23242.

- Salsgiver, E.L., Fink, A.K., Knapp, E.A., LiPuma, J.J., Olivier, K.N., Marshall, B.C., and Saiman, L. (2016) Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis, *Chest*, 149, 390–400, doi: 10.1378/chest.15-0676.
- 9. Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Martinez, F.J., and Huffnagle, G.B. (2016) The microbiome and the respiratory tract, *Annu. Rev. Physiol.*, **78**, 481–504, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238.
- Zakharkina, T., Heinzel, E., Koczulla, R.A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J.K., Baumbach, J., Herrmann, M., Grunewald, C., Dienemann, H., von Muller, L., and Bals, R. (2013) Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing, *PLoS One*, 8, e68302, doi: 10.1371/journal.pone. 0068302.
- Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Старинова Н.И., Капранов Н.И. (2019) В кн. Регистр больных муковис-

- *цидозом в Российской Федерации. 2017 год* (под ред. Воронковой А.Ю.), Медпрактика-М, Москва, 68 с.
- European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. Annual data report (year 2016), version 1.2018 (URL: www.ecfs.eu/ sites/default/files/general-content-images/working-groups/ ecfs-patient-registry/ECFSPR Report2016 06062018.pdf).
- Einarsson, G.G., Zhao, J., LiPuma, J.J., Downey, D.G., Tunney, M.M., and Elborn, J.S. (2019) Community analysis and co-occurrence patterns in airway microbial communities during health and disease, *ERJ Open Res.*, 5, 00128-2017, doi: 10.1183/23120541.00128-2017.
- Caverly, L.J., and LiPuma, J.J. (2018) Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice, *Exp. Rev. Respir. Med.*, 12, 857–865, doi: 10.1080/17476348.2018.1513331.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., and Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem, *J. Pediatr.*, 104, 206–210, doi: 10.1016/s0022-3476(84)80993-2.
- Lobo, L.J., Tulu, Z., Aris, R.M., and Noone, P.G. (2015) Pan-resistant *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotro-phomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis does not reduce survival after lung transplantation, *Transplantation*, 99, 2196–2202, doi: 10.1097/TP.00000000000000709.
- Voronina, O., Ryzhova, N., Kunda, M., Sharapova, N., Aksenova, E., Amelina, E., Shumkova, G., Simonova, O., Egorov, M., Kondratyeva, E., Chuchalin, A., and Gintsburg, A. (2018) Changes in airways bacterial community with cystic fibrosis patients' age and lung function decline. 41st European Cystic Fibrosis Conference, J. Cystic Fibrosis, 17 (Suppl. 3), S78, doi: 10.1016/S1569-1993(18)30366-7.
- Pletcher, S.D., Goldberg, A.N., and Cope, E.K. (2019) Loss of microbial niche specificity between the upper and lower airways in patients with cystic fibrosis, *Laryngoscope*, 129, 544–550, doi: 10.1002/lary.27454.
- Рыжова Н.Н., Воронина О.Л., Лосева Э.В., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Шарапова Н.Е., Шерман В.Д., Гинцбург А.Л. (2019) Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом, Сибирское медицинское обозрение, 2, 19–28, doi: 10.20333/2500136-2019-2-19-28.
- 20. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Шарапова Н.Е., Амелина Е.Л., Лазарева А.В., Черневич В.П., Симонова О.И., Жуховицкий В.Г., Жилина С.В., Семыкин С.Ю., Поликарпова С.В., Ашерова И.К., Орлов А.В., Кондратенко О.В. (2019) Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом, Сибирское медицинское обозрение, 2, 80—88, doi: 10.20333/2500136-2019-2-80-88.
- Voronina, O.L., Kunda, M.S., Ryzhova, N.N., Aksenova, E.I., Sharapova, N.E., Semenov, A.N., Amelina, E.L., Chuchalin, A.G., and Gintsburg, A.L. (2018) On Burkholderiales order microorganisms and cystic fibrosis in Russia, *BMC Genomics*, 19 (Suppl. 3), 74, doi: 10.1186/ s12864-018-4472-9.
- Voronina, O.L., Kunda, M.S., Ryzhova, N.N., Aksenova, E.I., Semenov, A.N., Lasareva, A.V., Amelina, E.L., Chuchalin, A.G., Lunin, V.G., and Gintsburg, A.L. (2015) The variability of

- the order Burkholderiales representatives in the healthcare units, *BioMed Res. Int.*, 2015, 680210, doi: 10.1155/2015/680210.
- Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Орлова А.А., Чернуха М.Ю., Лунин В.Г., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. (2013) Экспресс-диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом, Клиническая лабораторная диагностика, 11, 53–57.
- 24. Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., and Dowson, C.G. (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5644–5649, doi: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
- 25. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Овчинников Р.С., Федосова Н.Ф., Амелина Е.Л., Лунин В.Г., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. (2015) Разработка подходов к идентификации возбудителей микозов легких у больных муковисцидозом непосредственно в клинических образцах из респираторного тракта, *Лабораторная служба*, 4, 11—17.
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E.S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G.D., Collman, R.G., Bushman, F.D., and Li, H. (2012) Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances, *Bioinformatics*, 28, 2106–2113, doi: 10.1093/bioinformatics/bts342.
- Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов МГНЦ, Leiden Open Variation Database, v.3.0 (URL: http://seqdb.med-gen.ru/).
- 28. Clustering and classification methods for biologists.

  Manchester Metropolitan University (URL: http://www.angelfire.com/planet/biostats/upload.htm).
- Anderson, M.J. (2001) A new method for non parametric multivariate analysis of variance, *Austral. Ecology*, 26, 32–46, doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
- 30. Ginsburg, G.S., and Willard, H.F. (2009) Genomic and personalized medicine: foundations and applications, *Transl. Res.*, **154**, 277–287, doi: 10.1016/j.trsl.2009.09.005.
- 31. Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Gaur, S.N., Agarwal, K., Kathuria, S., Roy, P., Klaassen, C.H., and Meis, J.F. (2013) Schizophyllum commune as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases, *Mycoses*, **56**, 1–10, doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02190.x.
- 32. Biswas, K., Cavubati, R., Gunaratna, S., Hoggard, M., Waldvogel-Thurlow, S., Hong, J., Chang, K., Wagner Mackenzie, B., Taylor, M.W., and Douglas, R.G. (2019) Comparison of subtyping approaches and the underlying drivers of microbial signatures for chronic rhinosinusitis, *mSphere*, **4**, e00679-18, doi: 10.1128/mSphere.00679-18.
- 33. Lucas, S.K., Yang, R., Dunitz, J.M., Boyer, H.C., and Hunter, R.C. (2018) 16S rRNA gene sequencing reveals site-specific signatures of the upper and lower airways of cystic fibrosis patients, *J. Cyst. Fibros.*, **17**, 204–212, doi: 10.1016/j.jcf.2017.08.007.
- 34. Fothergill, J.L., Neill, D.R., Loman, N., Winstanley, C., and Kadioglu, A. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation in the nasopharyngeal reservoir leads to migration and persistence in the lungs, *Nat. Commun.*, 5, 4780, doi: 10.1038/ncomms5780.

#### CHARACTERISTICS OF THE AIRWAY MICROBIOME OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS\*

O. L. Voronina<sup>1\*\*,\*\*\*</sup>, N. N. Ryzhova<sup>1</sup>, M. S. Kunda<sup>1</sup>, E. V. Loseva<sup>1</sup>, E. I. Aksenova<sup>1</sup>, E. L. Amelina<sup>2</sup>, G. L. Shumkova<sup>2</sup>, O. I. Simonova<sup>3</sup>, and A. L. Gintsburg<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, 123098 Moscow, Russia; E-mail: olv550@gmail.com

<sup>2</sup> Pulmonology Research Institute, Federal Medical-Biological Agency, 115682 Moscow, Russia

<sup>3</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of Russia, 119296 Moscow, Russia

Received June 4, 2019 Revised July 29, 2019 Accepted September 10, 2019

Microbiota as an integral component of human body is actively investigated, including by massively parallel sequencing. However, microbiomes of lungs and sinuses have become the object of scientific attention only in the last decade. For patients with cystic fibrosis, monitoring the state of respiratory tract microorganisms is essential for maintaining lung function. Here, we studied the role of sinuses and polyps in the formation of respiratory tract microbiome. We identified Proteobacteria in the sinuses and samples from the lower respiratory tract (even in childhood). In some cases, they were accompanied by potentially dangerous basidiomycetes. The presence of polyps did not affect formation of the sinus microbiome. Proteobacteria are decisive in reducing the biodiversity of lung and sinus microbiomes, which correlated with the worsening of the lung function indicators. Soft mutations in the *CFTR* gene contribute to the formation of safer microbiome even in heterozygotes with class I mutations.

Keywords: microbiome, cystic fibrosis, airway, chronic rhinosinusitis, Proteobacteria

УДК 611.018.2

# БИОХИМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ФАКТОРАМИ РОСТА И ЦИТОКИНАМИ: ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ\*

#### Обзор

© 2020 П.И. Макаревич<sup>1,2</sup>\*\*, А.Ю. Ефименко<sup>1,2</sup>, В.А. Ткачук<sup>1,2,3</sup>\*\*\*

1 Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, 119991 Москва, Россия; электронная почта: pmakarevich@mc.msu.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт экспериментальной кардиологии, НМИЦ кардиологии Минздрава России, 121552 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 15.06.2019 После доработки 30.09.2019 Принята к публикации 16.10.2019

Сформировавшаяся в конце XX века регенеративная медицина использует культивированные клетки или тканеинженерные конструкции для трансплантации в организм человека с целью восстановления утраченных или поврежденных органов. Однако достигнутые в этом направлении практические успехи оказались далеки от многообещающих результатов, полученных в экспериментах. В поисках новых путей развития этой области стало очевидно, что успешное решение практических задач невозможно в отрыве от изучения фундаментальных принципов регуляции развития, обновления и восстановления тканей человека. Эти процессы успешно исследовались клеточными биологами, физиологами и биохимиками в рамках смежного направления, которое часто называют «регенеративной биологией». Было показано, что в ходе регенерации факторы роста, цитокины и гормоны регулируют не отдельные функции клеток, а, действуя через специфические системы рецепции, регулируют важные для восстановления ткани процессы – пролиферацию и дифференцировку клеток. Эти события требуют скоординированных стимулов и поэтому практически невоспроизводимы с помощью одиночных белков или низкомолекулярных соединений, т.е. плохо управляемы с помощью подходов классической фармакологии. Данный обзор суммирует актуальные представления о биохимических и клеточных механизмах регуляции обновления и регенерации тканей человека, обращая внимание на некоторые общебиологические и эволюционные аспекты в этой области. Особое внимание в нем уделяется биохимическим механизмам регуляции, в частности, роли факторов роста и цитокинов, а также механизмам рецепции этих молекул. В отдельном разделе затронуты перспективные практические подходы для активации регенерации с помощью малых молекул или секретома стволовых клеток, который содержит широкий репертуар факторов роста, цитокинов, пептидов, а также внеклеточные везикулы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** регенеративная медицина, стволовая клетка, фактор роста, цитокин, внутриклеточная сигнализация, рецепторная тирозиновая киназа.

DOI: 10.31857/S0320972520010029

В живых системах регенерация идет на всех уровнях — синтезируются и разрушаются молекулы, обновляются и восстанавливаются после повреждения ткани, гибнут и появляются новые

клетки [1]. Постоянная регенерация обеспечивает физиологическое обновление, поддерживающее соответствие организма структуре, выработанной в ходе эволюции, а обновление на моле-

Принятые сокращения: ГТ – генная терапия; МСК – мезенхимные стромальные клетки; РТК – рецепторные тирозиновые киназы; СК – стволовые клетки; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; ФР – факторы роста; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF, VEGF, EGF, IGF-1 – тромбоцитарный, эндотелиальный, эпидермальный и инсулиноподобный факторы роста соответственно; HGF – фактор роста гепатоцитов.

<sup>\*</sup> Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

<sup>\*\*\*</sup> Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

кулярном уровне необходимо для устойчивых взаимодействий внутри ткани и регуляции идущих в ней процессов.

Человек по своей способности к репаративной регенерации (т.е. регенерации после повреждения) значительно уступает другим многоклеточным организмам, однако процессы идущего в течение жизни обновления тканей имеют впечатляющие масштабы. Практически все клетки существуют определенный отрезок времени, по истечении которого происходит их программируемая гибель, после чего погибшая клетка ограниченное количество раз замещается вновь образованной клеткой такого же типа. Этот цикл является основой тканевого гомеостаза, т.е. постоянства клеточного состава ткани [2, 3]. Ежедневно у взрослого человека обновляется ~1% зрелых эритроцитов, т.е. за сутки разрушается 1011 красных клеток крови и столько же появляется за счет того, что из костного мозга каждую секунду выходит 2—3 млн новых эритроцитов [4]. Постоянное обновление с разной скоростью идет в коже, жировой ткани, во всех паренхиматозных и полых органах, сердечно-сосудистой и нервной системах. Можно сказать, что гибель и появление новых клеток формируют подобие прямой и обратной реакций с константами, меняющимися в разные периоды жизни организма, а также при его повреждении или болезни [5].

В этом отношении читателю может оказаться интересен классический труд Richard J. Goss «Principles of regeneration» («Принципы регенерации»), в котором он удачно заметил: «Если бы не было регенерации, то не стало бы живого. Но если бы все живое регенерировало, то не было бы смерти. Все многоклеточные организмы постоянно "живут" и "умирают", совмещая в себе эти две крайности» [1].

Не менее удачной является еще одна аналогия, приведенная David L. Stocum: «Регенерация позволяет живой системе ограниченное время противостоять разрушительному воздействию второго закона термодинамики, сохраняя свою целостность. В этой борьбе индивидуум обречен на поражение, но за время жизни он позволяет виду выйти из нее победителем, дав начало потомству» [6].

Выше мы упомянули, что млекопитающие по своим способностям к репаративной регенерации уступают другим позвоночным, например хвостатым амфибиям или рыбам, способным к многократному «отращиванию» конечностей и даже внутренних органов.

Глядя на эти примеры, исторически первым возникал вопрос: «Как они это делают?». Ответ на него дали фундаментальные работы по изучению регенерации у животных, которые прово-

дили с середины XIX века. Идея о том, что расшифровка механизмов регенерации у видов, которые к ней способны, поможет понять, как запустить аналогичный процесс у человека, выглядела совершенно логичной [7] и позволила, используя удачные объекты из животного мира, установить клеточные, молекулярные и, позднее, генетические основы этого феномена. При этом исследование позвоночных с выдающимися регенеративными возможностями позволило хорошо ответить на вопрос «как?», но не давало ответа на второй важный вопрос: «Почему некоторые виды лишены этих способностей?» [8].

Ответ на него может быть найден в сравнительных исследованиях двух близкородственных видов, один из которых способен регенерировать конечность или орган (вид A), а второй залечивает ранение с образованием культи или рубца (вид Б). Их сравнение позволило бы не только понять, что движет регенерацией вида A, но и разобраться в том, что блокирует ее у вида Б, например, какая регуляторная система или сигнальная ось была утрачена или кардинально изменилась в ходе расхождения этих таксонов.

Эта идея была частично реализована в работах по изучению заживления ран у млекопитающих на этапе эмбриона, которому присуща полная регенерация, притом что для взрослой особи этого же вида характерно рубцевание в зоне повреждения [9, 10]. Эти исследования внесли большой вклад в понимание возможностей регенерации у млекопитающих, однако их объединяет и общий изъян. На стадии эмбриона или плода организм характеризуется неполным развитием тканей и органов, специфическим гемопоэзом и незрелой иммунной системой, а также находится в водной среде в гипоксическом состоянии [11, 12].

В утробе клетки и ДНК плода защищены от повреждающего действия активных форм кислорода и излучения, а рождение на свет по масштабам перестройки организма в какой-то степени можно сравнить с выходом первых животных из воды на сушу. С той разницей, что на адаптацию у новорожденного уходят не миллионы лет, а несколько первых дней жизни. В этот момент организм из-за контакта с атмосферным уровнем кислорода испытывает колоссальный стресс, адаптируясь к новому уровню оксигенации тканей [13, 14]. В первую неделю жизни это приводит к шквалу эпигенетических модификаций, влияющих на экспрессию сотен генов, кодирующих белки и регуляторные малые РНК [15, 16]. У человека и других сухопутных млекопитающих это считается одной из предпосылок резкого падения регенеративных способностей в первые несколько дней жизни [16]. По этим причинам в настоящее время высказывают обоснованные сомнения в том, что сравнение регенерации эмбриона и взрослой особи релевантно и позволит достичь прорывных результатов в этой области.

#### РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ У ЧЕЛОВЕКА, ЕЕ ПРИРОДА И ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Происхождение регенеративных способностей у вида всегда рассматривалось с двух эволюционных позиций. Первая предполагает, что регенерация конечностей и органов носит приспособительный характер, и отдельные виды выработали эту способность. Для закрепления способности к регенерации необходимо соответствующее давление отбора – атаки естественных врагов и повреждения, в которых в природе нет недостатка. Однако в дикой природе особь, потерявшая часть тела, выживает с очень низкой вероятностью. Даже если принять, что способности отращивать плавники у рыб или хвост у ящерицы сформировались как приспособление после нападений естественных врагов, то сложнее будет таким же образом утверждать о приспособительном происхождении регенерации сердца, поджелудочной железы или печени. Травма этих органов почти всегда фатальна для особи, что едва ли позволит закрепиться любому новому признаку [17]. Более реалистичной и принятой в настоящее время представляется точка зрения на регенерацию как на «остаточную» характеристику, т.е. своеобразную рефлексию внутриутробного развития, способность к которой в ходе эволюции была, например, утрачена млекопитающими, однако сохранилась у амфибий и пресмыкающихся [18].

В конце ХХ века многие открытия, сделанные в регенеративной биологии, заложили базу для формирования нового направления – регенеративной медицины. Однако затем ее формирование происходило в отрыве от классических направлений биологии, из-за чего произошел определенный сдвиг в сторону ускорения трансляционных исследований без достаточного внимания к фундаментальным основам регенерации и развития организма. Большая часть используемых методов запуска регенерации у человека основана на трансплантации культивированных клеток или тканеинженерных конструкций [19]. При этом акцент в последние десятилетия был сделан на прикладных и технологических решениях без должного внимания к базовым принципам функционирования систем, контролирующих регенерацию у человека.

У человека репаративная регенерация возможна за счет нескольких механизмов (рис. 1).

Дифференцировка постнатальных стволовых клеток (СК). После рождения в большинстве тканей сохраняется и поддерживается пул тканеспецифичных (резидентных) СК. Они способны к самообновлению (делению без потери недифференцированного состояния), а также к дифференцировке в определенные типы клеток [20]. При физиологическом обновлении тканей они вместе с мезенхимными стромальными клетками (МСК) обеспечивают тканевой гомеостаз, а в случае повреждения становятся ключевым участником процесса регенерации [21]. Упомянутым выше МСК отводят роль клеток, которые отвечают за поддержание СК [22], участвуя в формировании микроокружения, называемого «нишей» [21].

Пролиферация дифференцированных клеток. Деление клеток организма считалось основным механизмом регенерации со времен формулировки положений классической клеточной теории [23]. Позднее выяснилось, что пролиферативный потенциал активно обновляющихся тканей (слизистых оболочек, печени, кожи) может быть недостаточен для поддержания постоянства структуры из-за предела Хейфлика и снижения пролиферативной способности клеток с возрастом [24, 25]. Более того, многократная пролиферация сопровождается накоплением «поломок» и сдвигами дифференцировочного состояния, которые лежат в основе развития дегенеративных заболеваний и опухолей [26]. Таким образом, пролиферация играет важную роль в регенерации, однако ее возможности на длительном промежутке времени выглядят ограниченными.

**Транзиторная дедифференцировка.** В тканях с низкой пластичностью при регенерации часть новых клеток появляется по механизму транзиторной дедифференцировки. В ходе этого процесса зрелая материнская клетка дает начало дочерним клеткам с такими же фенотипом и функцией, проходя через стадию дедифференцированной формы, обладающей пластичностью. При повреждении клетка подвергается эпигенетическим модификациям, в результате которых возможен ее временный возврат в менее специализированное состояние, в котором она способна к делению с последующей редифференцировкой для замещения утраченных клеток [27]. В организме человека так идет регенерация некоторых экзокринных желез, например, слюнной и поджелудочной [28, 29].

Прямая трансдифференцировка. Данный механизм заключается в конверсии зрелой клетки одного типа в другой без возвращения в низко-

#### 1. Пролиферация дифференцированных клеток 3. Дедифференцировка и пролиферация Тип А Дифф Тип А Дифd Дедифф Дифф 4. Трансдифференцировка 2. Дифференцировка стволовых клеток Дифф Тип А Тип Б Дедифф Дифф Дифф Самообновление Условные обозначения Тканеспецифичная Дедифференцированная Дифференцированные Коммитированный клетки различных типов предшественник стволовая клетка

**Рис. 1.** Основные механизмы репаративной регенерации у человека. Пояснения к рисунку даны в тексте. Условные обозначения: П – пролиферация; Дедифф – дедифференцировка; Дифф – дифференцировка

дифференцированные состояния, сопровождающиеся сильными изменениями потентности. Перепрограммирование осуществляется при активации специфических факторов транскрипции, как правило, экспрессирующихся в ходе эмбриогенеза (Oct-4, Klf-4, Nanog и др.), а также под контролем регуляторных (микро- и длинных некодирующих) РНК [30]. Это позволяет клетке миновать опасное с точки зрения канцерогенеза состояние плюрипотентности и превратиться в другую специализированную клетку [31]. Показано, что в организме человека регенерация с прямой трансдифференцировкой идет после повреждения островков Лангерганса [32, 33] и желчных протоков печени [34, 35].

Процессы регенерации и репарации идут длительно и регулируются гормонами, факторами роста (ФР), цитокинами, РНК различных классов и др. [36—38]. Рассмотрим подробнее регуляторные системы, влияющие на процессы регенерации и обновления ткани, а также ряд их особенностей важных с точки зрения биохимии и медицины.

### РЕГУЛЯЦИЯ ОБНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

Нейроэндокринная регуляция обновления и регенерации. Управление функциями всех клеток организма осуществляется интегральной нейроэндокринной системой, объединяющей регуляцию за счет нейромедиаторов и гормонов, которые различаются скоростью ответа на стимулы и его продолжительностью. Нервная система характеризуется быстрым, почти молниеносным, ответом, следующим за выбросом в синаптическую щель нейромедиаторов (ацетилхолина, серотонина, норадреналина и др.). Их рецепторы получили название ионотропных и представляют собой лиганд-зависимые трансмембранные ионные каналы [39, 40]. Активация таких каналов приводит к изменению поляризации мембраны, а эффекты запускаются и гасятся за доли секунды, что создает оперативный способ регуляции, лежащий в основе многих рефлекторных реакций (в том числе необходимых для выживания в критических ситуациях) [41].

Более длительными отрезками времени (минуты, часы) измеряются эффекты гормонов. Их рецепторами являются белки, расположенные как на мембране клетки, так и внутриклеточно: в цитоплазме, на мембранах органелл и в ядре. Гормональная регуляция не является системой «включения/выключения»: ее принцип работы скорее напоминает реостат. Регуляция обеспечивается наличием на мембране клетки нескольких типов рецептора к одному и тому же гормону (рис. 2, а). Примером является адренергическая рецепция, когда на одной клетке одновременно имеются трансмембранные β- и α-адренорецепторы, сопряженные с G<sub>s</sub>- и G<sub>i</sub>белками, разнонаправленно регулирующими активность аденилатциклазы и содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [42].

Известно, что процессы миграции, синтез и распад жирных кислот, полисахаридов и др. являются  $Ca^{2^+}$ -зависимыми. Эти процессы не могут идти по принципу «все или ничего», и механизм их регуляции зависит не от перепада концентрации  $Ca^{2^+}$  в цитоплазме, который имеет достаточно узкий интервал, а от частоты осцилляции  $Ca^{2^+}$ , которая варьирует в широком диапазоне. Такая система обеспечивает плавную, ступенчатую регуляцию  $Ca^{2^+}$ -зависимых процессов в клетке [43].

Таким образом, гормоны, в отличие от нейромедиаторов, действуют не на поляризацию мембраны, а через свои рецепторы активируют систему внутриклеточных вторичных посредников (цАМФ, цГМФ, ДАГ, Са<sup>2+</sup> и др.). Вторичные посредники передают сигнал внутрь клетки, запуская каскад химических модификаций белков (фосфорилирование, рибозилирование, ацетилирование и др.) [44], и управляют метаболическими процессами, что служит поводом отнести сами рецепторы гормонов к метаботропным.

Особенностью такой рецепции является феномен десенситизации, направленный на защиту клетки от слишком продолжительного действия гормона. Если гормон находится на рецепторе длительное время (более 8—10 мин), то происходит фосфорилирование рецептора лиганд-зависимой протеинкиназой, что приводит к снижению сродства рецептора к гормону [45]. При очень длительной (часами) стимуляции рецептора запускается процесс эндоцитоза, приводящий к даунрегуляции, вплоть до деградации рецептора в лизосоме [46]. Это ограничивает период влияния гормонов на клетку минутами, реже часами.

Более продолжительными могут быть эффекты липофильных стероидных и тиреоидных гормонов, которые проникают в цитоплазму и взаимодействуют с внутриклеточным рецепто-

ром, в комплексе с которым транслоцируются в ядро. Там комплекс «гормон—рецептор» способен связываться с хроматином и регулировать экспрессию генов, приводя к масштабным изменениям фенотипа клетки, которые сохраняются длительное время [47, 48].

При изучении механизмов гормональной регуляции на уровне одиночных клеток нами было показано, что гормональные сигналы критически важны для функционирования МСК, контролирующих тканевой гомеостаз и регенерацию при повреждении [49-51]. Мы обнаружили, что большинство МСК экспрессируют широкий репертуар рецепторов к гормонам и нейромедиаторам. При этом среди общей популяции только небольшая доля клеток (~5–7%) способна отвечать на тот или иной гормон активацией Са<sup>2+</sup> сигнализации, т.е. содержит необходимые компоненты внутриклеточной системы проведения сигнала. Более того, как стало известно, однократное воздействие гормона приводит к резкому росту доли клеток, способных к ответу на него же при повторном действии [51]. Это послужило основанием для предположения о «триггерной роли» популяции МСК, имеющих функционирующую систему рецепции гормона. Вероятно, в ответ на действие гормона чувствительные к нему клетки продуцируют факторы, действующие на окружающие МСК и увеличивающие их чувствительность к этому агонисту. В клетках-мишенях это может обеспечиваться как увеличением плотности рецептора на мембране, так и ростом экспрессии генов, кодирующих белки внутриклеточной сигнальной системы.

Мы также обнаружили, что однократная стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов вызывает в МСК переключение с цАМФ-зависимого на  $Ca^{2+}$ -зависимый путь передачи сигнала, т.е. происходит не десенситизация из-за избыточной активации рецептора, а отложенное во времени переключение сигнализации на каскад, исходно связанный с активацией  $\alpha_1$ -адренорецептора. Это явление представляет собой т.н. гетерологическую сенситизацию — уникальный механизм регуляции гормональной чувствительности, присущий МСК [50, 52].

Наконец, мы установили, что чувствительность стволовых клеток к некоторым гормонам сопряжена с гетерогенностью их дифференцировочного потенциала. В частности, у МСК из жировой ткани была обнаружена экспрессия всех компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), причем экспрессия рецепторов 2-го типа (АТ2) к ангиотензину-ІІ характеризовала субпопуляцию МСК с повышенной способностью к дифференцировке в адипоциты.

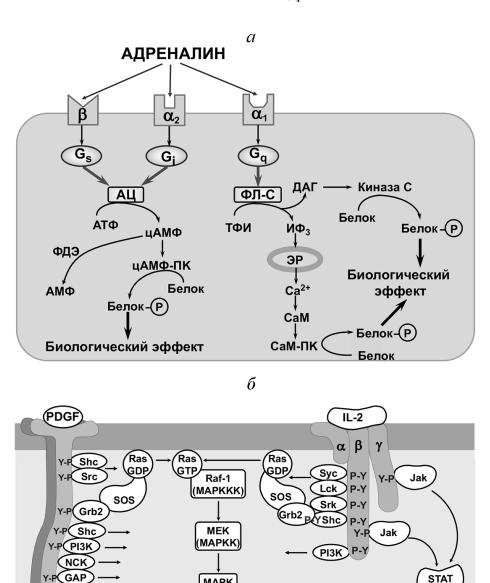


Рис. 2. Примеры сигнальных каскадов, запускаемых при активации рецепторов гормонов, факторов роста и интерлейкинов. a — Гормон может активировать различные сигнальные системы в зависимости от типа рецептора. Агонист (адреналин) может активировать один из трех типов рецепторов и передавать сигнал внутрь клетки с помощью разных G-белков, аденилатциклазной системы и фосфоинозитидного обмена. Условные обозначения: АЦ – аденилатциклаза; ФЛ-С – фосфолипаза С;  $T\Phi U$  – трифосфоинозитид;  $\mu AM\Phi$  –  $\mu U$  –  $\mu U$  нистический анденозинмонофосфат;  $\mu U$  –  $\mu U$  инозитол-1,4,5-трифосфоинозитид; фат; ЭР – эндоплазматический ретикулум; ДАГ – диацилглицерин; СаМ – кальмодулин; ПК – протеинкиназа; ФДЭ – фосфодиэстераза.  $\delta$  — Активация рецепторов факторов роста и цитокинов приводит к лиганд-зависимой олигомеризации и аутофосфорилированию по остаткам тирозина. Фосфотирозины являются сайтами связывания адаптерных белков и сигнальных молекул, в результате чего собирается сигнальный комплекс, осуществляющий передачу сигнала без участия вторичных посредников. Условные обозначения: Y-P – фосфотирозин; ATF-2, C-MYC, c-FOS, c-JUN – факторы транскрипции; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; STAT – активатор транскрипции челночного типа; Jak – Янус-киназа;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – субъединицы рецептора цитокина; IL-2 – интерлейкин-2; PDGF – тромбоцитарный фактор роста. Адаптировано из учебника В.А. Ткачука и соавт. «Основы молекулярной эндокринологии: рецепция и внутриклеточная сигнализация» [41]

MAPK

**MAPK** 

c-JUN

ATF2

Y-P SYP

(PLC-y1)

STAT

STAT

Эти же клетки способны продуцировать ангиотензин-II, который действует, вероятно, по аутокринному механизму, что приводит к мобилизации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. При этом мы наблюдали рост экспрессии мастер-генов адипогенеза — PPAR-ү и адипонектина [49] с последующей адипогенной дифференцировкой МСК.

Приведенные примеры иллюстрируют механизмы участия нейроэндокринной системы и убедительно показывают ее важность для оперативной регуляции миграции и чувствительности одиночной клетки в момент времени. Однако продолжительность эффектов нейромедиаторов и гормонов намного короче периода, необходимого для воссоздания структуры при репаративной регенерации, занимающей несколько суток или недель. Еще одним фактором, ограничивающим роль гормональной регуляции на всем протяжении регенеративного процесса, является динамичное изменение чувствительности клеток: это касается как десенситизации под влиянием агонистов рецепторов, так и упомянутых выше переключений сигнализации.

Факторы роста и цитокины – регуляторы обновления и регенерации с уникальным механизмом **рецепции.** Еще в 70-х годах XX века было показано, что после воздействия ФР и цитокинов их эффекты на миграцию и дифференцировку клеток сохраняются очень долгое время — часы и даже дни. Это позволило предположить, что после однократной стимуляции этими белками клетки секретируют другие аутокринные факторы, стимулирующие подвижность и дифференцировку [53, 54]. Также для ФР и цитокинов был описан мощный митогенный эффект, которым не обладали известные гормоны и который не блокировали существующие антагонисты метаботропных рецепторов, что позволило предположить наличие иных сигнальных путей, активируемых этими лигандами [55].

Чувствительность клетки к ФР и цитокинам обеспечивается особой группой трансмембранных белков, одновременно обладающих функциями рецептора и фермента. Всего известно ~60 таких белков, получивших название рецепторных тирозиновых киназ (РТК). Среди них выделяют несколько семейств: рецепторы факторов роста фибробластов (FGFR), рецепторы тромбоцитарного (PDGFR), эндотелиального (VEGFR) и эпидермального факторов роста (EGFR), а также инсулина и инсулиноподобного ФР (IR и IGF-1R) [56].

Несмотря на некоторые различия в структуре для большинства из них характерен общий принцип лиганд-зависимой димеризации с последующим аутофосфорилированием остатков тирозина в составе внутриклеточной части РТК

[56, 57], которое дает начало сигнальному каскаду (рис. 2,  $\delta$ ).

Следует отметить, что некоторые РТК способны к спонтанной димеризации в отсутствие связывания с ФР. Например, IR и IGF-1R экспрессируются на поверхность клетки уже в виде ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> димеров, связанных дисульфидными связями, однако тирозинкиназную активность они проявляют только после активации своими лигандами. Аналогично ведут себя EGFR, Tie-2 (рецептор ангиопоэтинов) и ряд рецепторов эфринов, причем для них описано формирование очень крупных олигомеров из нескольких десятков РТК [58]. Некоторые авторы предполагают, что такая олигомеризация необходима для регуляции передачи сигнала после связывания с соответствующим лигандом [59].

При активации РТК ответ отличается специфичностью в зависимости от фосфорилируемого остатка тирозина, а также многочисленными точками амплификации сигнала, обеспечивающими кооперативность действия нескольких ФР и цитокинов или «перехват» сигнала [56, 60]. Специфичность эффектов, вызываемых фосфорилированием конкретного остатка тирозина, обеспечивает плеотропный характер рецепции, т.е. возможность запуска разных сигнальных путей от одного рецептора (рис.  $2, \delta$ ). Остаток тирозина, фосфорилируемого в составе внутриклеточной части рецептора, определяет связывание с конкретной сигнальной молекулой и активацию сигнального пути. При этом РТК может как напрямую запускать определенный каскад, так и выступать в роли адаптерного белка, необходимого для сборки сигнальных комплексов. Сигнал через каскад внутриклеточных киназ достигает ядра, где активирует факторы транскрипции и контролирует экспрессию генов, клеточный цикл, выживаемость и дифференцировку клетки [61].

Длительное действие ФР обеспечивается возможностью многократного запуска сигнализации при повторной лиганд-зависимой сборке олигомерного комплекса РТК. Существующие механизмы эндоцитоза РТК могут уменьшать чувствительность клетки к ФР и цитокинам [62], однако здесь на первый план выходят упомянутые точки амплификации сигнала, на которых сходятся несколько путей, активируемых разными рецепторами.

Например, митоген-активируемая протеинкиназа (МАР-киназа) ERK является посредником сигнальных путей рецепторов EGF, PDGF и FGF [63]. По этой причине даунрегуляция одного из этих рецепторов не приведет к выключению пролиферации клетки, регулируемой ERK-зависимыми ядерными факторами Jun, Fos и Myc.

Таким образом, в отличие от гормонов и нейромедиаторов ФР и цитокины являются высокоспецифичными регуляторами клеточной программы. Они влияют на решение клетки о входе в клеточный цикл, подталкивают ее к миграции и дифференцировке в ходе развития или регенерации, т.е. к масштабным в плане структуры ткани событиям. Именно по этой причине логичным становится «дублирование» сигнальных путей от различных РТК и наличие точек амплификации, на которых сходятся сигнальные каскады от рецепторов разных ФР и цитокинов. Дифференцировка клетки, ее выживание, пролиферация, а главное – формирование новых тканевых структур, должны быть защищены от случайных воздействий, поэтому их запуск требует скоординированных сигналов от нескольких рецепторов и, соответственно, коктейля лигандов. Организованная таким образом система рецепции работает подобно фильтру, исключающему сигнальный «шум»: неспецифические или случайные воздействия [64].

Аналогично можно отметить дублирование функций и у самих ФР и цитокинов. Данная особенность является защитой от временных локальных условий, которые могут разрушать молекулы или менять их сродство к рецептору [65]. Например, при сопровождающем тяжелую гипоксию ацидозе некоторые ФР (IGF, bFGF) теряют способность связываться с рецептором изза снижения рН в ткани [66]. Однако другие ФР (VEGF165, TGF-β1) устойчивы к ацидозу и продолжают выполнять свои функции в этой области, стимулируя пролиферацию фибробластов и ангиогенез, сопровождающие заживление ран.

Еще одним примером может быть потеря активности фактором роста гепатоцитов (HGF), который нуждается в протеолитической активации для перехода в двухцепочечную форму, способную связываться с его рецептором — с-met [67]. При повреждении почек экспрессия про-HGF увеличивается в несколько раз, однако снижение продукции его активаторов (HGF-A, матриптаз, урокиназы и др.) делает этот ответ неэффективным из-за снижения активации HGF. Компенсаторным в этой ситуации является рост продукции IL-10, обладающего, как и HGF, противовоспалительным и противофибротическим действием, защищающим жизненно важный орган.

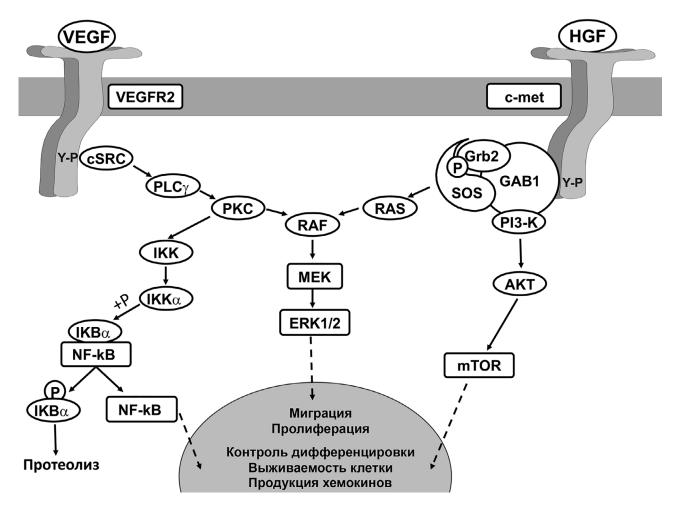
Чтобы проиллюстрировать важность плеотропии ФР в регуляции регенеративных процессов, приведем еще один пример. При восстановлении ткани VEGF и HGF обладают кооперативным действием на пролиферацию и миграцию эндотелия за счет усиления фосфорилирования ERK1/2 [68], однако эти ФР разнонаправ-

ленно регулируют в эндотелиоцитах активацию транскрипционного фактора NFкB (VEGF его активирует, а HGF подавляет, см рис. 3). Одной из мишеней NFкB является хемокин MCP-1 — эффективный хемоаттрактант моноцитов, являющихся ключевыми участниками ангио- и артериогенеза в сердце. Таким образом, несмотря на кооперативное действие VEGF и HGF на пролиферацию эндотелия, эти факторы разнонаправленно влияли на инвазию моноцитов, без которых затрудняется стабилизация вновь образованных в ткани сосудов [69].

Роль факторов роста и цитокинов в межклеточной коммуникации, развитии и регенерации. В чем же уникальность ФР и цитокинов и почему механизмы их рецепции являются важными для понимания регуляции регенеративного процесса? Эволюционно система РТК – одна из самых поздних, и долгое время считалось, что она является уникальной особенностью многоклеточных организмов. За 1,5 миллиарда лет эволюции, разделивших одноклеточные эукариоты и первые многоклеточные организмы, именно появление тирозинкиназной системы рецепции считают ключевым шагом для перехода к многоклеточному строению организмов. Ее роль заключается в установлении высшего уровня организации - межклеточных коммуникаций и организации клеток в ткани и органы [70]. Наличие выстроенной системы межклеточных взаимодействий отличает организмы с облигатно многоклеточным строением от колоний одноклеточных, формируемых по принципу временных сообществ. Вне такой колонии каждый отдельный организм в отсутствие партнеров довольствуется собственной системой рецепции внешних стимулов и может поддерживать вид за счет регулярного удвоения, что невозможно для многоклеточного организма.

РТК были обнаружены у Choanoflagellatea – жгутиковых простейших, способных к формированию колоний и представляющих собой сохранившееся переходное звено от одноклеточных к многоклеточным организмам [71]. В 2001 году Kind и Carroll впервые показали наличие у Monosiga brevicollis мембранного белка MBRTK1, обладающего тирозинкиназной активностью [72]. Далее было показано, что первые гены РТК появились у M. brevicollis  $\sim 600$  млн лет назад, причем в удивительно большом количестве. Всего у этого вида было идентифицировано 128 (!) генов, кодирующих РТК, что отражает первичную избыточность, возникшую в ходе приспособительной реакции, движущая сила которой остается нам неизвестной [73, 74].

Существующая за счет ФР, цитокинов и РТК система коммуникации критична для всех эта-



**Рис. 3.** При активации рецепторов VEGFR и с-met усиление митогенного сигнала и разнонаправленное действие на дифференцировку и выживаемость клетки обусловлено сигнализацией от тирозинкиназных рецепторов факторов роста. Усиление сигнала, активирующего пролиферацию и миграцию, происходит за счет кооперативного фосфорилирования RAF-киназы и активации сигнального пути киназы ERK1/2. При этом разнонаправленное влияние активации VEGFR2 и с-met на дифференцировку, продукцию воспалительных белков и выживаемость клеток также обусловлено активацией специфических сигнальных путей, регулирующих транскрипционные факторы и сигнальные комплексы, которые переключают экспрессию генов. Таким образом, тирозинкиназный путь рецепции может обеспечивать как усиление, так и различную направленность влияния  $\Phi$ P на одни и те же процессы в клетке

пов, требующих взаимодействия между клетками — от развития до обновления и регенерации в постнатальном периоде. Важную роль, начиная с ранних этапов эмбриогенеза, играют IGF, ТGF-β1 и -β3, HGF, PDGF-A и -В и появление спектра РТК, опосредующих чувствительность к перечисленным ФР [75]. Репертуар экспрессируемых ФР формирует сеть взаимных влияний между элементами, определяющими судьбу каждого из них и ход развития организма [56, 76]. Например, после первых дроблений зиготы между четырьмя бластомерами имеются существенные различия, хотя визуально они обладают совершенно неотличимой сферической формой. Каждый бластомер обладает уникальными признаками, а также спектром ФР и цитокинов, действующих ауто- и паракринно в крошечной,

но уже неоднородной системе. В опытах с разделением клеток из состава 4-х и 8-клеточных стадий развития мыши было показано, что одиночные бластомеры различаются по экспрессии β-катенина — важного участника канонического пути Wnt-сигналинга — каскада, задействованного в регуляции дифференцировочного статуса СК [77, 78]. Дальнейшие стадии эмбриогенеза характеризуются расширением репертуара продуцируемых ФР и чувствительности к ним. В результате этого начинается процесс специализации клеточных типов, зависящий от миграционной активности и дифференцировки плюри-, а затем мультипотентных СК в составе зародышевых листков [79].

С точки зрения организации ткани регенеративный процесс также характеризуется делени-

ем, специализацией клеток и усложнением структуры под контролем ФР и цитокинов. После повреждения на месте разрушенной ткани формируется временная структура, основой которой, как правило, является сгусток крови [80]. В зависимости от вида этой структурой может быть васкуляризованная, но не специализированная грануляционная ткань или бластема, состоящая из дедифференцированных соматических клеток. В дальнейшем для полноценной регенерации она должна быть в состоянии обеспечить условия для дифференцировки, правильной организации ткани и функционирования клеток, т.е. усложнения структуры [27]. Этот процесс зачастую подчиняется закономерностям, аналогичным тем, которые действовали на этапе эмбрионального развития затронутой части тела [81].

Стадийность и своевременное переключение стимулов необходимы для регенерации ткани. Все фазы репаративной регенерации — от гемостаза после повреждения до регенерации или фиброза — характеризуются активностью специализированных типов клеток, обладающих особенностями регуляции и, следовательно, требующих специфического набора стимулирующих и ингибирующих молекул [41, 82].

Самые ранние стадии (образование тромба и воспаление) высоко консервативны у позвоночных и обладают критическим значением для выживания особи и борьбы с инфекцией, которая попадает в зону повреждения. Активация тромбоцитов, помимо остановки кровотечения, сопровождается их дегрануляцией и выбросом хемоаттрактантов (IL-8, IL-6, IFN-у и др.), привлекающих в зону повреждения нейтрофилы. Их защитная функция реализуется за счет выброса токсических молекул и активной продукции свободных радикалов, уничтожающих в зоне повреждения как микробы, так и клетки макроорганизма. Массовая гибель нейтрофилов очищает рану и создает новый градиент цитокинов (MCP-1, MIP-1, TNF-α), привлекающих моноциты и запускающих их дифференцировку в макрофаги. Фагоцитирующие макрофаги поглощают клеточный дебрис, оставшийся после погибших нейтрофилов, и активно вырабатывают цитокины и ФР (IL-6, SDF-1α, FGF, PDGF, VEGF), которые привлекают в рану ключевых участников дальнейших событий – МСК, фибробласты и миофибробласты [21, 41]. Этими же ФР стимулируется пролиферация и дифференцировка клеток, их организация в упорядоченные структуры, необходимые для регенерации. Уже на примере первых этапов репаративной регенерации видно, что каждый тип клеток, активируемый специфическими стимулами, выполняет свою функцию и формирует набор стимулов, необходимых для запуска и регуляции следующего этапа [83].

Хорошей иллюстрацией жестко закрепленной стадийности регуляции, осуществляемой ФР, является опыт с эктопическим отрастанием конечности или хвоста у аксолотля. Оба этих процесса требуют последовательного переключения стимулов и кооперативного действия белков из семейств костных морфогенетических белков (BMP) и FGF [84]. Ни FGF2, ни FGF8, ни пара ВМР2/ВМР7 по одиночке не способны запустить полную регенерацию конечности [85]. Действие любого из перечисленных факторов вызывает появление на раневой поверхности временных структур, напоминающих бластему – группу дедифференцированных клеток, дающих начало отрастающей конечности. Однако только их кооперативное действие в определенной последовательности (во многом совпадающей с переключениями экспрессии генов в процессе эмбрионального развития) [68] позволяет добиться отрастания дополнительной части тела [86].

В недавно опубликованной работе Yu et al. [87] именно последовательным воздействием ВМР2 и ВМР9 удалось добиться регенерации ампутированной дистальной фаланги у млекопитающего (мыши), что, несомненно, стало выдающимся результатом. Однако следует отметить, что в ходе эволюции базовый принцип регенерации – последовательное образование и усложнение структуры - не изменился, что всегда будет требовать определенных стимулов в определенной последовательности. Отступление от этого принципа объясняет результаты клинических исследований, в которых не показала эффективности ни одна из молекул, активирующих СК. Предпринимались попытки применения ФР (VEGF, bFGF, HGF, PDGF и др.) и колониестимулирующих факторов (G-CSF), однако результаты их использования были очень скромными, несмотря на попытки подобрать приемлемые показания - начиная от лечения ожогов до сахарного диабета І типа [88].

Таким образом, регенеративный процесс не является функцией отдельно взятой клетки или результатом воздействия одиночных молекул на идущие в ней процессы. Он требует последовательной активации и регуляции различных типов клеток, участвующих в восстановлении структуры. Именно поэтому попытки стимулировать регенерацию лучше основывать не на активности важных для регенерации лигандов и рецепторов, а на воспроизведении стадийности с учетом особенностей процессов, происходящих при органогенезе или восстановлении ткани.

## МЕТОДОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ОБНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ

Генная терапия в регенеративной медицине. Под генной терапией (ГТ) понимают группу методов, направленных на модификацию последовательности генов или управление их экспрессией, а также изменение биологических свойств живых клеток для их терапевтического использования. Концепция гена как фармакологической мишени не нова — многие низкомолекулярные препараты и гормоны способны действовать на ДНК напрямую или опосредованно, влияя на метаболизм и жизнеспособность клетки. Однако концепция гена как активного начала лекарства впервые была сформулирована в начале 70-х годов ХХ века, дав начало этому направлению [89].

С точки зрения регуляции процессов регенерации ГТ позволила решить задачу продолжительной экспрессии ФР и цитокинов, активирующих процессы формирования новых структур, которые идут длительно - сутками и даже неделями. Добиться продолжительного действия этих белков локальным введением в ткань оказалось невозможно, так как время их жизни после локальной или системной инъекции было мизерным из-за деградации под влиянием протеаз и большого объема распределения. При этом их концентрация быстро снижалась ниже порога связывания с рецептором и, следовательно, прекращалось влияние на клетки-мишени. Генная терапия позволила превратить часть клеток органа в клетки-продуценты, которые нарабатывают белок, запускающий пролиферацию, миграцию и активирующий резидентные СК [90]. С помощью плазмидных и вирусных векторов в ткани были доставлены гены ФР (VEGF, HGF, ангиопоэтина-1, PDGF и др.), peгулирующие регенерацию и ее отдельные звенья: рост нервов и кровеносных сосудов, миграцию эпителия, защиту от фиброза и др. [69, 91-94].

В клинических исследованиях ГТ с помощью одного гена ФР (VEGF, HGF, FGF и др.) оказалась малоэффективной для стимуляции регенеративных процессов [92]. Биологических эффектов одного ФР или цитокина было достаточно для того, чтобы индуцировать рост отдельных структур (сосудов, аксонов), но не формирование ткани, которое требует каскада последовательно переключающихся стимулов. В этой области, как стало известно, возможны определенные улучшения с помощью комбинированной генной терапии несколькими ФР с до-

полняющими друг друга эффектами. Примером такой физиологически обоснованной комбинации может служить сочетание VEGF165 и ангиопоэтина-1. В этой паре VEGF165 играет роль активатора ангиогенеза, а ангиопоэтин-1 – аттрактанта перицитов и гладкомышечных клеток. Под влиянием VEGF165 происходит активный капиллярогенез, однако многие сформированные сосуды обладают повышенной проницаемостью или быстро разрушаются. Ангиопоэтин-1, сам по себе обладая очень скромным ангиогенным потенциалом, в комбинации с VEGF165 сыграл роль стабилизатора сосудов и оказался способен уменьшать побочные эффекты монотерапии VEGF. Более того, комбинирование этих генов значительно усилило васкуляризацию регенерирующей ткани по сравнению с каждым из них по отдельности [95]. Однако для запуска полноценной регенерации ткани или органа ГТ имеет ограниченный потенциал [90, 92, 96].

Следует отметить, что «моногенная» терапия оказалась эффективной для терапии наследственных заболеваний. Метод доставки «здоровой» копии гена стал примером этиотропной ГТ, направленной на устранение единственной причины заболевания, не корректируемой иными способами. Благодаря этому в настоящее время мы приблизились к возможности излечения ряда наследственных иммунодефицитов, энзимопатий, гемофилии А [97—99].

Стимуляция регенеративных процессов с помощью секретома стволовых клеток. Клеточную терапию длительное время рассматривали как способ получения «лекарства на основе стволовых клеток», причем в последние годы для этого активно использовали МСК из различных источников. Являясь удобным объектом и источником материала для клеточной терапии, они долгие годы считались одним из наиболее перспективных и безопасных инструментов для клеточной терапии. В пользу этого говорят положительные результаты применения МСК, однако в начале 2000-х годов все чаще стали появляться данные о невозможности интеграции клеток, введенных в ткань [100]. Ряд исследователей с разочарованием констатировали, что МСК оказались неспособны к включению в состав ткани, а их эффекты связаны с активностью продуцируемого ими секретома [100].

Протеомные исследования секретома МСК, в том числе проведенные нами [101], показали, что он содержит большое количество пептидных и белковых компонентов, многие из которых были идентифицированы как ФР, регуляторы метаболизма, компоненты внеклеточного матрикса и др. (рис. 4) [102, 103]. Все это состав-

ляет комплекс стимулов, упомянутый во вводной части, который, как оказалось, невозможно воспроизвести с помощью фармакологических препаратов или методов ГТ. Эти данные стали отражением биологической роли МСК – регуляторных клеток, имеющих базальный уровень секреторной активности, обеспечивающий тканевой гомеостаз, и при этом способных многократно ее повышать при повреждении для обеспечения регенерации. В пользу этого говорит их преимущественно периваскулярная локализация, где МСК одновременно экспонированы к воздействию системных стимулов (уровня глюкозы, кислорода, инсулина, гормонов крови) и локальных сигналов, возникающих в ткани. Такое положение обеспечивает рецепцию ими сигналов от организма в целом и от клеток in situ [102, 103]. Продуцируемый МСК секретом оказался очень удачным объектом для создания «регенеративного лекарства», которое отвечает ключевым требованиям с точки зрения регуляции регенерации. При этом комбинированное действие ФР приводит к усилению сигнала в точках амплификации, общих для сигнальных каскадов молекулах, воссоздавая картину кооперативной регуляции клетки суммой стимулов, а не одиночными молекулами.

Это стало основой для создания регенеративных препаратов, содержащих продуцируемые МСК белки и предназначенных для стимуляции восстановления ткани. Полученные нами

данные *in vivo* говорят о том, что секретом МСК обладает мощным ангиогенным и нейротрофным действием, стимулирует заживление после ожогов кожи, способен восстанавливать сперматогенез [101, 104].

Среди разрабатываемых в мире препаратов такого класса заслуживает упоминания Thero-101 (ранее известный, как NeuroFX) — инфузионный препарат для лечения последствий ишемического инсульта, основой которого является очищенная белковая фракция секретома МСК человека. В настоящее время разрабатывающая его компания готовится к первым клиническим исследованиям, которые позволят оценить эффективность этого подхода.

В отношении секретома МСК следует также отметить, что многие фармакологические эффекты основаны на продукции не только белков и пептидов, но и фракции внеклеточных везикул, включающей микровезикулы и экзосомы [105]. Долгое время их рассматривали как результат удаления из клеток отживших органелл, неправильно уложенных белков и др., однако сейчас мы можем с уверенностью говорить о том, что внеклеточные везикулы являются способом передачи информации между клетками. Более того, за счет присутствия в их составе нуклеиновых кислот (мРНК, микроРНК и др.), данный вид транспорта может являться способом горизонтального переноса генетической информации в организме человека, в т.ч. и при

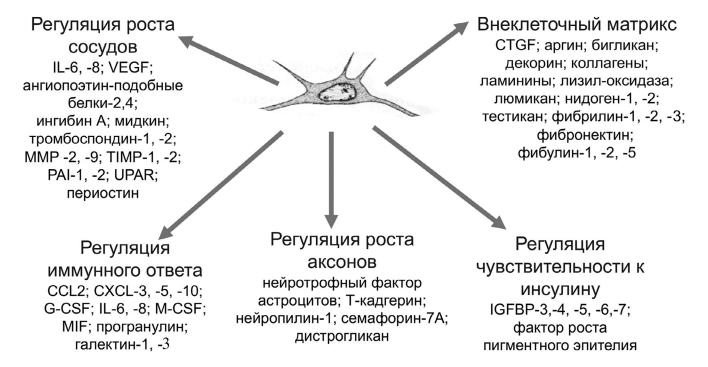


Рис. 4. Секретом МСК человека и основные функциональные группы идентифицированных в его составе молекул

стимуляции дедифференцировки и трансдифференцировки клеток в организме [106].

Таким образом, с точки зрения регенеративного процесса вводимые МСК действительно не способны интегрироваться в ткань, однако их секреторная активность позволяет влиять на большинство стадий восстановления после повреждения [104].

Введенные в поврежденную ткань МСК способны к рецепции условий микроокружения. При гипоксии или наличии высокого содержания воспалительных цитокинов IL-8 или TNF-α они способны в определенном диапазоне менять состав секретома, т.е. обладают адаптивностью [107, 108]. За счет этого МСК могут ускорять разрешение воспаления в его острой и острейшей фазах, а на более поздних этапах способствовать росту капилляров и нервных окончаний, необходимых для регенерации и восстановления ткани. Следует отметить, что МСК также могут под влиянием тканевого окружения приобретать фенотип миофибробластов, способных усиливать фиброз в зоне повреждения и рубцевание ткани [109, 110].

Таким образом, секреторная активность МСК может быть использована для создания препаратов на основе секретома, однако они представляют собой коктейль факторов, полученных в культуре и, соответственно, не могут воспроизвести стадийность регенерации, о важности которой было сказано выше. Вводимые в ткань МСК способны адаптивно менять свою секреторную активность в зависимости от условий окружения, однако есть данные об их участии в фиброзировании поврежденных органов. Оба этих пути имеют свои перспективы и, вероятно, найдут свои показания. В настояшее время существуют возможности для управления состоянием МСК и других типов клеток in vitro. Имитация напряжения сдвига, внесение различных активирующих молекул или гипоксия позволяют эффективно менять состав секретома. Эти приемы могут быть использованы для получения эффективных бесклеточных препаратов различной «модальности», пригодных для использования при широком спектре заболеваний.

Тканеспецифичные стволовые клетки и их ниша как терапевтическая мишень. Длительное время одними из самых перспективных объектов с точки зрения регенеративной медицины являлись тканеспецифичные СК. Они были обнаружены во всех паренхиматозных органах человека, в легких, коже, криптах кишки и др. Эти постнатальные СК существуют в виде ограниченной популяции недифференцированных клеток, сохраняющихся в ходе эмбрионального развития и участвующих в обновлении и регенерации ткани [111].

Однако раз за разом исследователи обнаруживали, что выделенные из тканей тканеспецифичные СК не были способны дать начало ткани или сформировать ее эквивалент с полноценной функцией. В ряде случаев ситуацию удавалось частично улучшить с помощью тканевой инженерии и использования скаффолдов (синтетических матриксных каркасов или децеллюляризованных органов) [112]. Более того, некоторые тканеспецифичные СК по-прежнему не удается запустить даже в ранние стадии органогенеза вне организма. Например, известные несколько десятилетий сателлитные клетки скелетных мышц хорошо активируются in vitro, экспрессируя транскрипционные факторы, отвечающие за миогенез и формируя структуры, аналогичные миофибриллам [113]. При этом добиться от них полноценной и регулируемой сократительной активности с возможностью интеграции в ткань не удалось [114].

Эти результаты можно объяснить двумя причинами: 1) СК, утрачивая контакт со своим специфическим окружением, теряет свою способность к полноценной дифференцировке; 2) запущенная в дифференцировку СК, дойдя по стадии коммитированных клеток-предшественников, требует полноценного окружения, чтобы созреть до терминально дифференцированного состояния и встроиться в ткань морфологически и функционально [21, 22].

В итоге мы приходим к выводу о том, что функциональной единицей регенерации является не сама по себе СК с ее внутренними свойствами, а комплекс, состоящий из СК и ее специфического окружения, играющего регуляторную роль. Это окружение получило название «ниша», и в современном представлении о регуляции регенеративного процесса именно ему отводится роль в рецепции активирующих стимулов и контроле «судьбы» СК на ранних этапах дифференцировки [115]. Вопросам анатомии ниш различных типов и механизмам их регуляции посвящено множество замечательных обзорных публикаций, поэтому мы лишь позволим себе уточнить, что в состав ниши, помимо самой СК, входят растворимые факторы, белки матрикса и поддерживающие клетки. При этом в отношении других типов клеток мы вновь обращаем внимание на МСК, которые во многих нишах играют роль как в поддержании покоящегося состояния СК, так и в ее активации. Наконец, свой ключевой вклад МСК вносят при завершении регенерации на этапе формирования специфичного для ткани матриксного, сосудистого и нейрального компонентов [116].

Возвращаясь к предмету обзора, мы можем предположить, что в регенеративной медицине будущего на первый план выйдет понимание механизмов функционирования ниши СК и разработка способов ее контролируемой активации или восстановления после повреждения. Многие подходы, вероятно, будут основаны на описанных в первой части принципах регуляции, базирующихся на последовательном переключении факторов и стимулов, вначале активирующих СК, а затем поддерживающих созревание СК в ходе регенерации.

Таким образом, в дальнейшем мы сможем уйти от этапа культивирования СК ex vivo, так как это несет в себе риски (контаминация микробами, хромосомные аберрации и генетические перестройки) и приводит к потере СК их регенеративных свойств, определяемых условиями ниши. Конечно, в ряде случаев СК и клетки их окружения исходно имеют сниженный регенеративный потенциал: существует понятие об истощении пула СК по мере старения, а также показаны неблагоприятные эффекты метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний на их основные физиологические функции [117]. В данной ситуации перед нами встает задача более глубокого понимания процессов, которые протекают в нише и как именно действуют на нее повреждающие факторы. В перспективе это создаст основы для управления нишей СК, а в дальнейшем и подходы к блокировке или подавлению формирования патологических ниш, например, ниш опухолевых СК [118].

Использование «малых молекул» для регенеративной медицины. В ходе изложения мы подошли к важному направлению в регенеративной медицине – регуляции обновления и регенерации ткани *in situ*. В этом плане было бы несправедливо обделить вниманием ряд «малых молекул», например, специфических ингибиторов белков и регуляторных каскадов, контролирующих статус СК. В США сейчас готовится к клиническим исследованиям комбинированный препарат FX-322, включающий два низкомолекулярных ингибитора. Мишень первого ингибитора — киназа-3 гликогенсинтазы (GSK-3), ингибирование которой приводит к активации пути Wnt — ключевого регулятора многих прогениторных клеток. Второй ингибитор блокирует активность гистоновой деацетилазы (HDAC1), уменьшая ее скручивающее действие на цепочку ДНК. Суммой этих эффектов оказалась активация Lgr5<sup>+</sup> прогениторных клеток, которые являются предшественниками волоскового сенсорного эпителия, чье отмирание в раннем возрасте стало встречаться все чаще из-за распространенности наушников и персональных аудиоустройств. При локальном введении в среднее ухо FX-322 активирует Lgr5<sup>+</sup> прогениторные клетки, вызывая восстановление сенсорного эпителия и слуховой чувствительности. Аналогичным образом данный «коктейль» ингибиторов может быть эффективным в нише крипты кишки, регенерация эпителия которой тоже зависит от Lgr5<sup>+</sup> клеток. Наконец, Lgr5<sup>+</sup> клетки содержатся в волосяной луковице, поэтому одним из перспективных показаний для FX-322 является и алопеция различного генеза.

Таким образом, на этом примере мы видим, что удачно подобранная комбинация фармакологических ингибиторов оказывается эффективным стимулятором регенерации за счет действия на тканеспецифичные СК и позволяет избежать этапа их культивирования. К слову, возвращаясь к самой первой части обзора, следует отметить, что и здесь механизмом действия препарата является ингибирование мишеней, а не их активация, как это происходит под действием, например, секретома МСК или белка, продуцирующегося после доставки гена в ткань.

Ограничением описанной стратегии может стать истощение пула тканеспецифичных СК, однако в такой ситуации могут быть использованы методы, направленные на активацию пролиферации с помощью вирусной доставки генов, кодирующих положительные регуляторы клеточного цикла или регуляторные РНК, вызывающие ограниченную дедифференцировку зрелых клеток и их пролиферацию с последующей редифференцировкой. Более того, данный подход может быть совмещен с описанной выше стратегией, как, например, это было сделано в опыте по активации пролиферации зрелых кардиомиоцитов мыши [119]. В этом эксперименте было установлено, что введение в миокард генов 4-х регуляторов клеточного цикла (CDK1, циклина B, CDK4 и CCND) вызывает пролиферацию кардиомиоцитов. При этом оказалось, что использование двух низкомолекулярных ингибиторов, подавляющих активность TGF-\(\beta\)1 и киназы Wee-1, позволяет добиться того же эффекта введением только двух факторов (СDK4 и CCND).

Еще одним перспективным подходом является трансдифференцировка клеток *in situ* путем доставки факторов транскрипции или регуляторных РНК с помощью вирусов или экзосом. В ряде экспериментов было показано прямое перепрограммирование фибробластов в гепатоциты, кардиомиоциты и клетки дермы, минуя стадию плюрипотентности [34, 35, 120].

Таким образом, в настоящее время мы вплотную приблизились к созданию подходов, основанных на комбинации генной терапии и

фармакологической регуляции дифференцировки, которые можно использовать для активации обновления и регенерации ткани после повреждения.

Изучение регуляции регенеративных процессов, сколь ни сложным может показаться этот предмет, все чаще дает прорывные результаты. В XXI веке за неполные 20 лет удалось добиться регенерации сердца и частей конечности у млекопитающих, установить закономерности, описывающие падение способности к репаративной регенерации после рождения и, наконец, установить ~20 новых мишеней, отвечающих за функционирование СК в постнатальном периоде. Расширившаяся методическая база от релевантных животных моделей до РНК-секвенирования одиночных клеток - дала уникальные возможности для фундаментальных исследований в области регенеративной биологии и медицины.

В данном обзоре мы постарались дать читателю представление о расшифрованных регуляторных системах, которые являются объектами для регенеративной медицины настоящего.

Это направление, пройдя солидную историю развития, сейчас подошло к точке, когда конвергенция с регенеративной биологией (от которой она заимствовала многие базовые понятия и частично методологию) является наиболее разумным путем развития. Изучение молекулярных механизмов регуляции СК долгое время было флагманским направлением в этой науке и дало множество перспективных технологий. Однако сейчас на первый план выходят задачи, связанные с пониманием того, как после повреждения в постнатальном периоде клетки могут воспроизвести процессы организации ткани, которые шли в эмбриогенезе.

Оптимизм исследователям внушает тот факт, что в организме человека не оказалось эволюционно выработанной блокировки регенерации, все клеточные механизмы, присущие животным, эффективно восстанавливающим свои части тела, могут в ответ на повреждение идти в тканях *Homo sapiens*. Помимо пролиферации

зрелых клеток и дифференцировки СК, идут процессы дедифференцировки и прямой конверсии одного типа клеток в другой в ответ на повреждение. Таким образом, в регенеративной биологии и медицине ближайших десятилетий станет важным изучение регенерирующей ткани как созревающей (по аналогии с эмбриогенезом) системы межклеточных взаимодействий, опосредованных ФР и цитокинами. Реализация корректной программы этого процесса долгое время ассоциировалась с активацией резидентных СК, однако сейчас все большее внимание уделяется нише - ее специфическому регуляторному окружению. Результатами этих исследований уже стали практические успехи - созданные методы запуска регенерации без культивирования клеток вне организма, т.е. in situ, с помощью малых молекул, методов ГТ и секретома постнатальных СК.

Несомненно, важным с точки зрения биохимической регуляции этих процессов останется изучение метаболической регуляции регенерации и сигнальных механизмов, отвечающих за передачу стимула, и контроль судьбы клетки. Обнаружение новых мишеней в ближайшем будущем останется за классическими подходами клеточной биологии и биохимии, однако распространяющееся применение методов генной инженерии и биоинформатики значительно увеличит эффективность их поиска с быстрой проверкой на релевантных модельных объектах.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30007) (подготовка рукописи и обеспечение доступа к первоисточникам) и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-1068.2019.7 (подготовка иллюстраций).

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goss, R.J. (1969) Principles of regeneration, Academic Press, New York.
- 2. Wyllie, A.H. (1987) Apoptosis: cell death in tissue regulation, *J. Pathol.*, **153**, 313–316.
- 3. Guillot, C., and Lecuit, T. (2013) Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis, *Science*, **340**, 1185–1189.
- 4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*, Garland Science, New York, pp. 1616.
- Iismaa, S.E., Kaidonis, X., Nicks, A.M., Bogush, N., Kikuchi, K., Naqvi, N., Harvey, R.P., Husain, A., and Graham, R.M. (2018) Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues, NPJ Regen. Med., 3, 6.
- 6. Stocum, D.L. (2012) An Overview of Regenerative Biology, in *Regenerative Biology and Medicine (Second Edition)*, Academic Press, San Diego. pp 3–20.
- 7. Goss, R.J. (1980) Prospects of regeneration in man, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 270–282.

- 8. Seifert, A.W., and Muneoka, K. (2018) The blastema and epimorphic regeneration in mammals, *Dev. Biol.*, **433**, 190–199.
- 9. Bleacher, J.C., Adolph, V.R., Dillon, P.W., and Krummel, T.M. (1993) Fetal tissue repair and wound healing, *Dermatol. Clin.*, **11**, 677–683.
- Dostal, G.H., and Gamelli, R.L. (1993) Fetal wound healing, Surg. Gynecol. Obstet., 176, 299–306.
- 11. Burrington, J.D. (1971) Wound healing in the fetal lamb, *J. Pediatr. Surg.*, **6**, 523–528.
- 12. Frantz, F.W., Diegelmann, R.F., Mast, B.A., and Cohen, I.K. (1992) Biology of fetal wound healing: collagen biosynthesis during dermal repair, *J. Pediatr. Surg.*, **27**, 945–948; discussion 949.
- Buonocore, G., Perrone, S., and Tataranno, M.L. (2017) Oxidative stress in the newborn, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, 1094247.
- Torres-Cuevas, I., Parra-Llorca, A., Sanchez-Illana, A., Nunez-Ramiro, A., Kuligowski, J., Chafer-Pericas, C., Cernada, M., Escobar, J., and Vento, M. (2017) Oxygen and oxidative stress in the perinatal period, *Redox. Biol.*, 12, 674–681.
- 15. Yun, M.H. (2015) Changes in regenerative capacity through lifespan, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 25392–25432.
- 16. Nakada, Y., Canseco, D.C., Thet, S., Abdisalaam, S., Asaithamby, A., Santos, C.X., Shah, A.M., Zhang, H., Faber, J.E., Kinter, M.T., Szweda, L.I., Xing, C., Hu, Z., Deberardinis, R.J., Schiattarella, G., Hill, J.A., Oz, O., Lu, Z., Zhang, C.C., Kimura, W., and Sadek, H.A. (2017) Hypoxia induces heart regeneration in adult mice, *Nature*, 541, 222–227.
- Simkin, J., and Seifert, A.W. (2018) Concise review: translating regenerative biology into clinically relevant therapies: are we on the right path? *Stem Cells Transl. Med.*, 7, 220–231.
- Gawriluk, T.R., Simkin, J., Thompson, K.L., Biswas, S.K., Clare-Salzler, Z., Kimani, J.M., Kiama, S.G., Smith, J.J., Ezenwa, V.O., and Seifert, A.W. (2016) Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals, *Nat. Commun.*, 7, 11164.
- Christ, G.J., Saul, J.M., Furth, M.E., and Andersson, K.E. (2013) The pharmacology of regenerative medicine, *Pharmacol. Rev.*, 65, 1091–1133.
- Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011) The cellular basis for animal regeneration, *Dev. Cell.*, 21, 172–185.
- Nimiritsky, P.P., Eremichev, R.Y., Alexandrushkina, N.A., Efimenko, A.Y., Tkachuk, V.A., and Makarevich, P.I. (2019) Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, pii: E823, doi: 10.3390/ijms20040823.
- Nimiritsky, P.P., Sagaradze, G.D., Efimenko, A.Y., Makarevich, P.I., and Tkachuk, V.A. (2018) The stem cell niche, *Tsitologiya*, 60, 575–586.
- 23. Mazzarello, P. (1999) A unifying concept: the history of cell theory, *Nat. Cell Biol.*, 1, E13–E15.
- 24. Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 72–76.
- Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 482–496.
- Klochendler, A., Weinberg-Corem, N., Moran, M., Swisa, A., Pochet, N., Savova, V., Vikesa, J., Van de Peer, Y., Brandeis, M., Regev, A., Nielsen, F.C., Dor, Y., and Eden, A. (2012) A transgenic mouse marking live replicating cells reveals in vivo transcriptional program of proliferation, Dev. Cell, 23, 681–690.
- 27. Brockes, J.P., and Kumar, A. (2008) Comparative aspects of animal regeneration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 525–549.

- 28. Wang, W.E., Li, L., Xia, X., Fu, W., Liao, Q., Lan, C., Yang, D., Chen, H., Yue, R., Zeng, C., Zhou, L., Zhou, B., Duan, D.D., Chen, X., Houser, S.R., and Zeng, C. (2017) Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury, *Circulation*, 136, 834–848.
- 29. Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation, *Nature*, **464**, 606–609.
- 30. Takahashi, K. (2014) Cellular reprogramming, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, pii: a018606, doi: 10.1101/cshperspect.a018606.
- 31. Kelaini, S., Cochrane, A., and Margariti, A. (2014) Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state, *Stem Cells Cloning*, 7, 19–29.
- 32. Criscimanna, A., Speicher, J.A., Houshmand, G., Shiota, C., Prasadan, K., Ji, B., Logsdon, C.D., Gittes, G.K., and Esni, F. (2011) Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following pancreatic damage in adult mice, *Gastroenterology*, **141**, 1451–1462, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.003.
- 33. Beer, R.L., Parsons, M.J., and Rovira, M. (2016) Centroacinar cells: at the center of pancreas regeneration, *Dev. Biol.*, **413**, 8–15.
- 34. Raven, A., Lu, W.Y., Man, T.Y., Ferreira-Gonzalez, S., O'Duibhir, E., Dwyer, B.J., Thomson, J.P., Meehan, R.R., Bogorad, R., Koteliansky, V., Kotelevtsev, Y., Ffrench-Constant, C., Boulter, L., and Forbes, S.J. (2017) Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration, *Nature*, 547, 350–354.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D., and Willenbring, H. (2011) Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration, J. Clin. Invest., 121, 4850–4860.
- 36. Discher, D.E., Mooney, D.J., and Zandstra, P.W. (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells, *Science*, **324**, 1673–1677.
- 37. Michalopoulos, G.K. (1990) Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control, *FASEB J.*, **4**, 176–187.
- 38. Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997) Liver regeneration, *Science*, **276**, 60–66.
- Ткачук В.А. (1994) Физиология эндокринной системы, Успехи физиологических наук, 25, 47–54.
- 40. Ткачук В.А. (1987) Роль и место циклических нуклеотидов в нейронэдокринной регуляции клеток и тканей, *Научные доклады высшей школы. Биологические науки*, 5–17.
- 41. Ткачук В.А., Воротников А.В., Тюрин-Кузьмин П.А. (2017) Основы молекулярной эндокринологии: рецепция и внутриклеточная сигнализация, ГЭОТАР-Медиа, Москва.
- Grigorian, G.Y., Mirzapoyazova, T.Y., Resink, T.J., Danilov, S.M., and Tkachuk, V.A. (1989) Regulation of phosphoinositide turnover in endothelium from human pulmonary artery, aorta and umbilical vein. Antagonistic action on the beta-adrenoceptor coupled adenylate cyclase system, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21, Suppl. 1, 119–123.
- 43. Tkachuk, V.A. (2000) Membrane receptors and intracellular calcium, *Membr. Cell Biol.*, 13, 263–285.
- 44. Ткачук В.А., Авакян А.Е. (2003) Молекулярные механизмы сопряжения G-белков с мембранными рецепторами и системами вторичных посредников, *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **89**, 1478—1490.
- 45. Tkachuk, V.A. (1982) Regulation of adenylate cyclase by hormones and guanine nucleotides in normal, desensitized, and resensitized rabbit heart, *Adv. Myocardiol.*, **3**, 305–316.

- 46. Ткачук В.А. (1989) Развитие десенситизации и гиперчувствительности аденилатциклазной системы сердца под влиянием гормонов, Кардиология, 29, 122–125.
- Ткачук В.А., Рыбин В.О., Никашин А.В. (1994) Стероидные и тиреоидные гормоны в регуляции G-белков, связывающих мембранные рецпторы с системами вторичных посредников, Доклады Российской академии медицинских наук, 7-12.
- 48. Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014) Nuclear
- receptors, RXR, and the big bang, *Cell*, **157**, 255–266. Sysoeva, V.Y., Ageeva, L.V., Tyurin-Kuzmin, P.A., Sharonov, G.V., Dyikanov, D.T., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2017) Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor, Stem *Cell Res.*, **25**, 115–122.
- Tyurin-Kuzmin, P.A., Chechekhin, V.I., Ivanova, A.M., Dyikanov, D.T., Sysoeva, V.Y., Kalinina, N.I., and Tkachuk, V.A. (2018) Noradrenaline sensitivity is severely impaired in immortalized adipose-derived mesenchymal stem cell line, Int. J. Mol. Sci., 19, pii: E3712, doi: 10.3390/ijms19123712.
- Tyurin-Kuzmin, P.A., Fadeeva, J.I., Kanareikina, M.A., Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Dyikanov, D.T., Stambolsky, D.V., and Tkachuk, V.A. (2016) Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells, Sci. Rep., 6, 32835.
- Tyurin-Kuzmin, P.A., Dyikanov, D.T., Fadeeva, J.I., Sysoeva, V.Y., and Kalinina, N.I. (2018) Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adiposederived mesenchymal stem/stromal cells, Sci. Data, 5, 180196.
- 53. Levi-Montalcini, R., and Booker, B. (1960) Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, 373-384.
- 54. Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and evelid opening in the new-born animal, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555–1562.
- Cohen, S. (2008) Origins of growth factors: NGF and EGF, J. Biol. Chem., 283, 33793-33797.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, Cell, 141, 1117–1134.
- Hunter, T. (2015) Discovering the first tyrosine kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, 7877-7882.
- Clayton, A.H., Walker, F., Orchard, S.G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E.C., and Burgess, A.W. (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis, J. Biol. Chem., 280, 30392-30399.
- 59. Himanen, J.P., and Nikolov, D.B. (2003) Eph signaling: a structural view, Trends Neurosci., 26, 46-51.
- 60. Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., and Lander, E.S. (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes, Cell, 97, 727-741.
- Katz, M., Amit, I., and Yarden, Y. (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases, Biochim. Biophys. Acta, 1773, 1161–1176.
- Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 5, a017459.
- Roskoski, R., Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.*, **66**, 105–143.
- Ihle, J.N. (1995) Cytokine receptor signalling, *Nature*, **377**, 591–594.
- D'Arcangelo, D., Facchiano, F., Barlucchi, L.M., Melillo, G., Illi, B., Testolin, L., Gaetano, C., and Capogrossi, M.C.

- (2000) Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression, Circ. Res., **86**, 312–318.
- Green, J., and Maor, G. (2000) Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers, Kidney Int., 57, 2258-2267.
- 67. Conway, K., Price, P., Harding, K.G., and Jiang, W.G. (2006) The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing, Wound Repair Regen., 14, 2-10.
- Satoh, A., and Makanae, A. (2014) Conservation of position-specific gene expression in axolotl limb skin, Zool. Sci., 31, 6-13.
- Makarevich, P.I., Dergilev, K.V., Tsokolaeva, Z.I., Boldyreva, M.A., Shevchenko, E.K., Gluhanyuk, E.V., Gallinger, J.O., Menshikov, M.Y., and Parfyonova, Y.V. (2018) Angiogenic and pleiotropic effects of VEGF165 and HGF combined gene therapy in a rat model of myocardial infarction, PLoS One, 13, e0197566.
- Rokas, A. (2008) The molecular origins of multicellular transitions, Curr. Opin. Genet. Dev., 18, 472-478.
- King, N. (2004) The unicellular ancestry of animal development, Dev. Cell, 7, 313-325.
- King, N., and Carroll, S.B. (2001) A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 15032-15037.
- Pincus, D., Letunic, I., Bork, P., and Lim, W.A. (2008) Evolution of the phospho-tyrosine signaling machinery in premetazoan lineages, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 9680-9684.
- Manning, G., Young, S.L., Miller, W.T., and Zhai, Y. (2008) The protist, Monosiga brevicollis, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 9674–9679.
- Mummery, C.L., van den Eijnden-van Raaij, A.J., Feijen, A. Freund, E., Hulskotte, E., Schoorlemmer, J., and Kruijer, W. (1990) Expression of growth factors during the differentiation of embryonic stem cells in monolayer, Dev. Biol., 142, 406 - 413.
- Shilo, B.Z. (2005) Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time, Development, 132, 4017-4027.
- 77. Piotrowska-Nitsche, K., Perea-Gomez, A., Haraguchi, S., and Zernicka-Goetz, M. (2005) Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties, Development, 132, 479-490.
- Zdravkovic, T., Nazor, K.L., Larocque, N., Gormley, M., Donne, M., Hunkapillar, N., Giritharan, G., Bernstein, H.S., Wei, G., Hebrok, M., Zeng, X., Genbacev, O., Mattis, A., McMaster, M.T., Krtolica, A., Valbuena, D., Simon, C., Laurent, L.C., Loring, J.F., and Fisher, S.J. (2015) Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification, *Development*, **142**, 4010-4025.
- Manca, A., Capsoni, S., Di Luzio, A., Vignone, D., Malerba, F., Paoletti, F., Brandi, R., Arisi, I., Cattaneo, A., and Levi-Montalcini, R. (2012) Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 2009-2014.
- Ud-Din, S., Volk, S.W., and Bayat, A. (2014) Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives, Exp. Dermatol., 23, 615-619.
- 81. Bielefeld, K.A., Amini-Nik, S., and Alman, B.A. (2013) Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration, Cell. Mol. Life Sci., 70, 2059–2081.

- 82. Kalinina, N.I., Sysoeva, V.Y., Rubina, K.A., Parfenova, Y.V., and Tkachuk, V.A. (2011) Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair, *Acta Naturae*, **3**, 30–37.
- 83. Takeo, M., Lee, W., and Ito, M. (2015) Wound healing and skin regeneration, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 5, a023267.
- Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2016) Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians, *Dev. Biol.*, 410, 45–55.
- 85. Makanae, A., Hirata, A., Honjo, Y., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2013) Nerve independent limb induction in axolotls, *Dev. Biol.*, **381**, 213–226.
- 86. Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2014) Implication of two different regeneration systems in limb regeneration, *Regeneration (Oxf)*, 1, 1–9.
- 87. Yu, L., Dawson, L.A., Yan, M., Zimmel, K., Lin, Y.L., Dolan, C.P., Han, M., and Muneoka, K. (2019) BMP9 stimulates joint regeneration at digit amputation wounds in mice, *Nat. Commun.*, **10**, 424.
- 88. Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014) Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen.*, 22, 569–578.
- 89. Friedmann, T., and Roblin, R. (1972) Gene therapy for human genetic disease? *Science*, **175**, 949–955.
- Makarevich, P.I., and Parfyonova, Ye.V. (2017) Therapeutic angiogenesis: foundations and practical application, in *Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy*, Intech Open, London, pp. 343–364.
- 91. Boldyreva, M.A., Bondar, I.V., Stafeev, I.S., Makarevich, P.I., Beloglazova, I.B., Zubkova, E.S., Shevchenko, E.K., Molokotina, Y.D., Karagyaur, M.N., Ratner, E.I., and Parfyonova, Y.V. (2018) Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury, *Biomed. Pharmacother.*, 101, 682–690.
- 92. Макаревич П.И., Рубкина К.А., Дыйканов Д.Т., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. (2015) Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития, *Кардиология*, **55**, 59—71.
- 93. Karagyaur, M., Dyikanov, D., Makarevich, P., Semina, E., Stambolsky, D., Plekhanova, O., Kalinina, N., and Tkachuk, V. (2015) Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration, *Biomed. Pharmacother.*, **74**, 63–70.
- 94. Makarevich, P., Tsokolaeva, Z., Shevelev, A., Rybalkin, I., Shevchenko, E., Beloglazova, I., Vlasik, T., Tkachuk, V., and Parfyonova, Y. (2012) Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle, *PLoS One*, 7, e38776.
- 95. Shyu, K.G., Chang, H., and Isner, J.M. (2003) Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hindlimb ischemia, *Life Sci.*, 73, 563–579.
- Слободкина Е.А., Макаревич П.И., Долинкин А.О. (2018) Разработка генотерапевтических лекарственных препаратов, Биофармацевтический журнал, 10, 3–14.
- 97. Badat, M., and Davies, J. (2017) Gene therapy in a patient with sickle cell disease, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 2093–2094.
- Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G.F., Wong, W.Y., and Pasi, K.J. (2017) AAV5-Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A, N. Engl. J. Med., 377, 2519–2530.

- Dunbar, C.E., High, K.A., Joung, J.K., Kohn, D.B., Ozawa, K., and Sadelain, M. (2018) Gene therapy comes of age, *Science*, 359, pii: eaan4672, doi: 10.1126/science.aan4672.
- 100. Savukinas, U.B., Enes, S.R., Sjoland, A.A., and Westergren-Thorsson, G. (2016) Concise review: the bystander effect: mesenchymal stem cell-mediated lung repair, Stem Cells, 34, 1437–1444.
- 101. Kalinina, N., Kharlampieva, D., Loguinova, M., Butenko, I., Pobeguts, O., Efimenko, A., Ageeva, L., Sharonov, G., Ischenko, D., Alekseev, D., Grigorieva, O., Sysoeva, V., Rubina, K., Lazarev, V., and Govorun, V. (2015) Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes, *Stem Cell Res. Ther.*, 6, 221.
- 102. Rolandsson Enes, S., Ahrman, E., Palani, A., Hallgren, O., Bjermer, L., Malmstrom, A., Scheding, S., Malmstrom, J., and Westergren-Thorsson, G. (2017) Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry. Sci. Rep., 7, 9316.
- MSC using DIA-mass spectrometry, *Sci. Rep.*, 7, 9316.

  103. Kim, H.S., Choi, D.Y., Yun, S.J., Choi, S.M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P., and Kim, D.W. (2012) Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells, *J. Proteome Res.*, 11, 839–849.
- 104. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Kalinina, N., Akopyan, Z., and Efimenko, A. (2019) Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, pii: E1656, doi: 10.3390/ijms20071656.
- Phinney, D.G., and Pittenger, M.F. (2017) Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy, *Stem Cells*, 35, 851–858.
- 106. Bang, O.Y., and Kim, E.H. (2019) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle therapy for stroke: challenges and progress, *Front. Neurol.*, **10**, 211.
- 107. Zubkova, E.S., Beloglazova, I.B., Makarevich, P.I., Boldyreva, M.A., Sukhareva, O.Y., Shestakova, M.V., Dergilev, K.V., Parfyonova, Y.V., and Menshikov, M.Y. (2016) Regulation of adipose tissue stem cells angiogenic potential by tumor necrosis factor-Alpha, *J. Cell. Biochem.*, 117, 180–196.
- Efimenko, A., Starostina, E., Kalinina, N., and Stolzing, A. (2011) Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning, *J. Transl. Med.*, 9, 10.
- 109. Aleksandrushkina, N.A., Danilova, N.V., Grigorieva, O.A., Mal'kov, P.G., Popov, V.S., Efimenko, A.Y., and Makarevich, P.I. (2019) Cell sheets of mesenchymal stromal cells effectively stimulate healing of deep soft tissue defects, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 167, 159–163.
- Baertschiger, R.M., Serre-Beinier, V., Morel, P., Bosco, D., Peyrou, M., Clement, S., Sgroi, A., Kaelin, A., Buhler, L.H., and Gonelle-Gispert, C. (2009) Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver, *PLoS One*, 4, e6657.
- 111. Shi, S., and Gronthos, S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 696–704.
- 112. Murphy, A.R., Laslett, A., O'Brien, C.M., and Cameron, N.R. (2017) Scaffolds for 3D *in vitro* culture of neural lineage cells, *Acta Biomater.*, **54**, 1–20.
- 113. Pourquie, O., Al Tanoury, Z., and Chal, J. (2018) The long road to making muscle *in vitro*, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **129**, 123–142.
- 114. Syverud, B.C., VanDusen, K.W., and Larkin, L.M. (2016) Growth factors for skeletal muscle tissue engineering, *Cells Tissues Organs*, **202**, 169–179.
- 115. Cosson, S., Otte, E.A., Hezaveh, H., and Cooper-White, J.J. (2015) Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 156–164.

- Lane, S.W., Williams, D.A., and Watt, F.M. (2014)
   Modulating the stem cell niche for tissue regeneration, Nat. Biotechnol., 32, 795–803.
- 117. Efimenko, A.Y., Kochegura, T.N., Akopyan, Z.A., and Parfyonova, Y.V. (2015) Autologous stem cell therapy: how aging and chronic diseases affect stem and progenitor cells, *Biores. Open Access*, 4, 26–38.
  118. Chacon-Martinez, C.A., Koester, J., and Wickstrom, S.A.
- 118. Chacon-Martinez, C.A., Koester, J., and Wickstrom, S.A. (2018) Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity, *Development*, **145**.
- 119. Mohamed, T.M.A., Ang, Y.S., Radzinsky, E., Zhou, P., Huang, Y., Elfenbein, A., Foley, A., Magnitsky, S., and Srivastava, D. (2018) Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration, *Cell*, **173**, 104–116, e112.
- 120. Huang, P., Zhang, L., Gao, Y., He, Z., Yao, D., Wu, Z., Cen, J., Chen, X., Liu, C., Hu, Y., Lai, D., Hu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Cheng, X., Ma, X., Pan, G., Wang, X., and Hui, L. (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes, *Cell Stem Cell*, 14, 370–384.

#### BIOCHEMICAL REGULATION OF REGENERATIVE PROCESSES BY GROWTH FACTORS AND CYTOKINES: BASIC MECHANISMS AND RELEVANCE FOR REGENERATIVE MEDICINE\*

#### **Review**

P. I. Makarevich<sup>1,2</sup>\*\*, A. Yu. Efimenko<sup>1,2</sup>, and V. A. Tkachuk<sup>1,2,3</sup>\*\*\*

Lomonosov Moscow State University, Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, 119991 Moscow, Russia; E-mail: pmakarevich@mc.msu.ru
 Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia
 Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, 121552 Moscow, Russia

Received June 15, 2019 Revised September 30, 2019 Accepted October 16, 2019

At the end of the 20th century regenerative medicine still uses cultured cells or tissue-engineered structures for transplantation into human body to restore lost or damaged organs. However, at the turn of the century, practical achievements in this field were far from the promising experimental results. It became apparent that successful resolution of practical problems is impossible without understanding fundamental regulation mechanisms of development, renewal and restoration of human tissues. These aspects have been successfully investigated by cell biologists, physiologists, and biochemists working in the field of "regenerative biology". Their studies revealed that during regeneration, growth factors, cytokines and hormones act beyond regulation of cell individual functions, but activating specific receptor systems, they control key tissue repair processes including cell proliferation and differentiation. These events require numerous coordinated stimuli and therefore are practically irreproducible using single proteins or low molecular weight compounds, i.e., poorly managed using classical pharmacological approaches. This review summarizes current views on regulatory mechanisms of renewal and regeneration in human tissues with emphasis on certain general biological and evolutionary aspects in this area. A special attention is focused on biochemical mechanisms of regulation, in particular, the role of growth factors and cytokines, as well as on mechanisms of their reception. Promising practical approaches for activating regeneration using small molecules or stem cell secretome, which contains a wide repertoire of growth factors, cytokines, peptides, as well as extracellular vesicles, are discussed in a separate section.

Keywords: regenerative medicine, stem cell, growth factor, cytokine, intracellular signaling, receptor tyrosine kinase

УДК 577.1

#### РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ И ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА ЖИВОТНЫХ ТИАМИНОМ *in vitro* И *in vivo*\*

© 2020 О.А. Меженская<sup>1</sup>, В.А. Алешин<sup>2,3</sup>, Т. Кэне<sup>4</sup>, А.В. Артюхов<sup>2,3</sup>, В.И. Буник<sup>2,3</sup>\*\*\*\*

1 Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, 01601 Киев, Украина

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт экспериментальной медицины Университета им. Отто фон Гюрике, 39120 Магдебург, Германия

> Поступила в редакцию 05.08.2019 После доработки 24.09.2019 Принята к публикации 24.09.2019

Для исследования механизмов некоферментного взаимодействия тиамина и его дифосфата (ТДФ) с белками мозга ацетоновый экстракт синаптосом мозга быка или гомогенат коры мозга крысы подвергали аффинной хроматографии на модифицированной тиамином сефарозе (тиамин-сефарозе). В последовательных элюатах тиамином (при рН 7,4 или 5,6), хлоридом натрия и мочевиной характеризовали представленность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и изоферментов малатдегидрогеназ (МДГ) методом масс-спектрометрии, а также изменение активностей данных ферментов в присутствии тиамина и/или ТДФ. Активация малатдегидрогеназной реакции тиамином максимальна после элюции белков синаптосомальной фракции кислым раствором тиамина, не приводящей к высвобождению МДГ1. Влияние экзогенного тиамина или ТДФ на активность ГДГ зависит от присутствия эндогенных регуляторов фермента. Так, тиамин и/или ТДФ активируют ГДГ мозга в элюатах с тиамин-сефарозы, но ингибируют фермент в наносимых на тиамин-сефарозу препаратах. Установлено, что ТДФ ингибирует ГДГ, активированную ADP. Активация ГДГ тиамином (но не ТДФ) снижена при ее элюции NaCl и мочевиной после применения кислого раствора тиамина по сравнению с аналогичными фракциями после элюции слабощелочным раствором тиамина. Одновременное повышение содержания МДГ2 и общей активности ГДГ в данных фракциях свидетельствует о роли известного взаимодействия ГДГ с МДГ2 в стабилизации активности ГДГ и регуляции ГДГ тиамином. Биологический потенциал регуляции ГДГ мозга тиамином подтвержден в экспериментах in vivo, установивших изменение регуляторных свойств ГДГ мозга после введения крысам высокой дозы тиамина. Биоинформатический анализ наборов элюируемых тиамином с тиамин-сефарозы белков показал специфическое обогащение их аннотации терминами «фосфобелок», «ацетилирование» и «метилирование». Связь тиамина с посттрансляционными модификациями в мозге может вносить вклад в механизмы нейропротекторного действия высоких доз тиамина, включающие регуляцию окисления основного возбуждающего нейромедиатора мозга глутамата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тиамин, малатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, тиамин-сефароза, фосфобелок, ацетилирование, метилирование.

**DOI:** 10.31857/S0320972520010030

Тиамин (витамин B1) является одним из основных витаминов группы B, широко применяемых в медицинской практике в силу своего нейротропного эффекта и стимулирующего

влияния на центральный метаболизм глюкозы [1-3]. В основном такое действие приписывают дифосфорилированному производному тиамина — тиаминдифосфату (ТДФ), который являет-

Принятые сокращения: ГДГ — глутаматдегидрогеназа; МДГ — малатдегидрогеназа; ОПИ — общий поток ионов; ТДФ — тиаминдифосфат; тиамин-сефароза — сефароза, модифицированная тиамином.

<sup>\*</sup> Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

<sup>\*\*</sup> Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

<sup>\*\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

ся необходимым коферментом таких ферментов центрального метаболизма, как транскетолаза и дегидрогеназы 2-оксокислот. Однако в последнее время, в т.ч. в связи с угрожающими темпами роста нейродегенеративных заболеваний, все большее внимание привлекают и другие, так называемые некоферментные, механизмы действия тиамина и его природных производных [4-7]. В качестве эффекторов не только ТДФ-зависимых, но и сопряженных с ними ферментов тиаминовые соединения могут обеспечить системную регуляцию метаболизма за счет воздействия на множественные белкимишени. Такое плейотропное действие тиаминовых соединений лучше объясняет ряд экспериментальных результатов по регуляции данными соединениями продукции ацетилхолина, которые плохо согласуются с чисто коферментным действием ТДФ [5, 6]. Следует отметить, что плейотропный характер действия генов [8] и белковых регуляторов метаболизма (например, таких белков, как транскрипционные регуляторы p53 или Nrf-2 [9]) хорошо известен, однако для низкомолекулярных регуляторов такая множественность мишеней действия традиционно рассматривается лишь как источник побочных эффектов [10]. Тем не менее в последнее время возрастает внимание к возможности повышения эффективности терапии при использовании лекарств, эффекты которых опосредованы множественным действием на несколько мишеней [11]. В этой связи изучение молекулярных механизмов аналогичной регуляции природными низкомолекулярными соединениями, включая витамины, вызывает особый интерес [6, 12].

Данная работа развивает описанный ранее подход для исследования множественных мишеней действия тиамина, использующий аффинную хроматографию фракций мозга на носителе, содержащем ковалентно связанный тиамин, с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков в элюате [6]. По сравнению с предыдущим исследованием, в котором связанные с модифицированной тиамином сефарозой (тиамин-сефарозой) белки мозга крысы (так называемый тиаминовый протеом) элюировались неспецифическими агентами, в настоящей работе охарактеризована аффинная рНзависимая элюция белков с тиамин-сефарозы тиамином, использован иной способ модификации носителя тиамином, исключающий множественную ориентацию «наживки» на носителе, и проведено сравнительное исследование профилей элюции с тиамин-сефарозы белков синаптосомальной фракции и полного гомогената мозга быка и крысы. В результате получены новые данные о путях и молекулярных механизмах некоферментного действия тиамина и его природных производных.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Использованы реактивы следующих производителей: ТДФ, 2-оксоглутарат (динатриевая соль), NADH (динатриевая соль), ADP, GTP, CHAPS, ингибиторы протеаз AEBSF, апротинин, бестатин, Е-64, лейпептин, пепстатин A - «Sigma», США; тиамин, полиэтиленгликоль- $600\overline{0}$ , глюкоза, Tris-HCl — «Serva», Германия; глицерол — «Biomedicals, LLC», США; NAD+ - «Gerbu», Германия. В части экспериментов применяли бикарбонатный физиологический раствор Кребса-Рингера, содержавший 118 MM NaCl, 2,34 MM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,6 MM KCl, 1,19 MM MgSO<sub>4</sub>, 2,42 MM CaCl<sub>2</sub>, 24,9 MM NaHCO<sub>3</sub> и 10 мМ глюкозы, рН 7,4. Растворы готовили на деионизированной воде стандарта Milli-Q, использованные в работе соли были наивысшей степени чистоты.

Эксперименты с животными. Для получения белков из мозга крыс использовали белых крыс линии Wistar, содержавшихся на стандартном рационе в виварии МГУ им. М.В. Ломоносова с постоянным доступом к воде и пище при световом цикле 12/12 ч (световая фаза с 9:00 до 21:00 по местному времени), температуре  $(21\pm2)$  °C и относительной влажности воздуха  $(53\pm5)$ %. Крыс умерщвляли методом декапитации с помощью гильотины. Мозги быков возрастом 1,5-3 года были получены на бойне (г. Киев).

Аффинной хроматографии подвергали гомогенаты коры мозга самок крыс линии Wistar массой 250-300 г; действие высоких доз тиамина исследовали на самцах линии Wistar массой 300-350 г (возраст 3-4 мес.). Экспериментальным животным вводили тиамин из расчета 400 мг/кг веса (водный раствор 200 мг/мл тиамина гидрохлорида, рН после добавления NaOH составлял 6,7-6,9) внутрибрющинно в вечернее время (17:00-19:00). Крысам контрольной группы вводили аналогичный объем 0,9%-ного раствора NaCl. Для инъекций использовали инсулиновые шприцы в соответствии с опубликованными рекомендациями [13]. Через 24 ч после инъекций проводили декапитацию животных.

Аффинная хроматография. Ацетоновый порошок из частично очищенной фракции митохондрий мозга быка получали согласно ранее описанной методике [14] и хранили сухим при -70 °C. Экстракцию белков ацетонового порошка проводили буфером Кребса—Рингера соглас-

но ранее описанному протоколу [6]. Гомогенат коры мозга крыс получали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [15].

В хроматографии использовали аффинный сорбент тиамин-N-4-азобензоил-є-гидразидсефарозу 4В (тиамин-сефароза), синтезированный по методу Клящицкого с соавт. [16]. Экстракт ацетонового порошка мозга или полный гомогенат коры мозга наносили на колонку с тиаминсефарозой, предварительно уравновешенную буфером Кребса—Рингера. Скорость потока в ходе нанесения образцов и последующего промывания носителя составляла 0,2 мл/мин. Удаление несвязавшихся или слабосвязавшихся белков контролировали по снижению оптической плотности элюата при 280 нм до базовой линии.

Связавшиеся с тиамин-сефарозой белки элюировали в несколько стадий. Первая стадия — элюция 5 или 10 мМ тиамином, рН 7,4 или 5,6. Для дальнейшей ступенчатой элюции использовали 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4, содержавший 1 М NaCl или 2 М мочевину, как описано ранее [6]. Замену буфера на 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4, проводили одновременно с концентрированием элюатов с помощью центрифужных фильтров Атисоп Ultra 15 с мембраной, непроницаемой для белков массой свыше 30 кДа. Сорбент регенерировали промыванием 8 М мочевиной и деионизированной водой и хранили в 0,02%-ном растворе азида натрия.

Измерение ферментативных активностей. Активность NADH-зависимых дегидрогеназ — малатдегидрогеназы (МДГ) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ) — измеряли по поглощению NADH при 340 нм. Характеристику профилей элюции проводили путем измерения активностей ферментов при насыщающих концентрациях субстратов. Для исследования влияния тиамина или ТДФ на активности ферментов использовали специфические для каждого фермента условия максимизации эффектов [6]. Детали использованных условий приведены в подписях к рисункам и таблицам.

Частичную очистку ГДГ мозга крысы для исследования совместных эффектов ТДФ и АDР проводили следующим образом. Экстракцию белков осажденной из гомогената мозга мембранной фракции осуществляли путем обработки ультразвуком и добавления детергента СНАРЅ (1%). Из полученного в результате центрифугирования (40 мин, 11 000 g, 4 °C) супернатанта удаляли фракцию полиферментных комплексов добавлением 0,16 объема 35%-ного полиэтиленгликоля при рН 6,15 с последующим центрифугированием (15 мин, 18 500 g, 4 °C). Полученный супернатант содержал частично очищенную из мозга крысы ГДГ.

Для кинетической характеристики использовали ГДГ и МДГ в составе объединенных гомогенатов мозга исследуемой группы крыс в рамках одной экспериментальной серии (по три животных в контрольной группе и группе крыс, которым вводили тиамин). Эксперименты на животных повторяли в трех независимых сериях – общее число животных составило 18 крыс. Гомогенаты мозга готовили согласно ранее описанному протоколу [15], нерастворимую фракцию осаждали центрифугированием (30 мин, 20 000 g, 4°C). Для удаления содержащихся в гомогенатах мозга низкомолекулярных соединений – регуляторов исследуемых ферментов – супернатант подвергали быстрой гель-фильтрации на колонке HiTrap<sup>TM</sup> Desalting, 5 мл («GE Healthcare», Швеция) согласно протоколу производителя. Белки элюировали 100 мМ Tris-HCl, pH 7,5. Данные кинетических экспериментов (n = 3) объединяли и аппроксимировали в программе GraphPad Prism v. 8.0 с использованием встроенных моделей. Для аппроксимации насыщения 2-оксоглутаратом и глутаматом применяли модель полного субстратного ингибирования:  $v = V_{\text{max}} \cdot [S]/(K_{\text{m}} + [S](1 + [S]/K_{\text{i}})),$  где v — скорость реакции при данной концентрации субстрата [S],  $V_{\rm max}$  — максимальная скорость реакции,  $K_{\rm m}$  – константа Михаэлиса,  $K_{\rm i}$  – константа субстратного ингибирования. Насыщение ГДГ ингибитором (GTP) или активаторами (ADP и лейцин) характеризуется кооперативными взаимодействиями субъединиц. Поэтому данные зависимости аппроксимировали с помощью модели логистической регрессии с четырьмя параметрами («four parameter logistic regression», 4PL), учитывающей отличие коэффициента Хилла от единицы.

**Измерение концентрации белка в образцах.** Концентрацию белка определяли по методу Лоури с соавт. [17].

Характеристика тиамин-зависимых протеомов исследуемых образцов. Элюированные с тиаминсефарозы белки, составляющие так называемый тиамин-зависимый протеом наносимых на аффинную колонку биологических образцов, разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующей идентификацией методом масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза, как описано ранее [6]. Для идентификации полученных пептидов использовали базы данных NCBI. Ввиду отсутствия аннотаций для части белков быка, для более полной идентификации этих белков проводили поиск по последовательностям базы данных SwissProt для всех организмов. Белки крысы идентифицировали с использованием последовательностей базы данных SwissProt для крысы.

Биоинформатический анализ элюированных с тиамин-сефарозы протеомов проводили с помощью программы DAVID v. 6.8, как описано ранее [6].

Определение относительного содержания пептидов ГДГ и МДГ в образцах. Содержание исследуемых белков в частично очищенных препаратах оценивали с помощью полуколичественного метода, основанного на пропорциональности количества белка в препарате числу идентифицированных при масс-спектрометрии пептидов [18]. Для сравнения разных образцов в геле использовали отношение числа идентифицированных пептидов исследуемого фермента к общему потоку ионов (ОПИ) при масс-спектрометрическом анализе соответствующей пробы, поскольку ОПИ пропорционален общему уровню определяемых в пробе пептидов. Значения ОПИ получали с помощью аналитической платформы Skyline [19]. Для удобства представления нормализованных данных использовали параметр ОПИ с коэффициентом  $10^{-10}$  (ОПИ ·  $10^{-10}$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аффинная хроматография на тиамин-сефарозе синаптосомальной фракции мозга быка. В табл. 1 представлено сравнение активности и числа пептидов ГДГ из синаптосомальной фракции мозга быка на разных стадиях аффин-

ной хроматографии в зависимости от значения рН (7,4 или 5,6) на первой, аффинной, стадии элюции. По данным масс-спектрометрии видно, что в обоих случаях ГДГ хорошо элюируется мочевиной: в данном элюате обнаруживается значительное число пептидов ГДГ даже в том случае, когда фермент плохо элюируется на предыдущих стадиях (табл. 1). Однако при элюции мочевиной после первичной элюции кислым (рН 5,6) раствором тиамина удельная и общая активности ГДГ на порядок и более превышают таковые в элюате мочевиной после первичной элюции слабощелочным (рН 7,4) раствором тиамина. Кроме того, при первичной элюции кислым раствором тиамина распределение общей активности ГДГ, элюируемой на трех стадиях, хорошо согласуется с представленностью фермента в элюатах по данным масс-спектрометрии, т.е. более высокая общая активность соответствует большему числу уникальных пептидов ГДГ во фракции. Напротив, при первичной элюции ГДГ слабощелочным раствором тиамина (рН 7,4) ее активность, измеряемая в получаемом на этой стадии элюате, составляет основную долю общей активности ГДГ, элюируемой с тиамин-сефарозы. При этом удельная активность ГДГ на стадии элюции слабощелочным раствором тиамина вдвое превышает таковую при первичной элюции кислым раствором тиамина. Однако по данным масс-спектрометрии фракция, полученная при элюции слабощелоч-

**Таблица 1.** Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и уникальные для ГДГ пептиды в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка

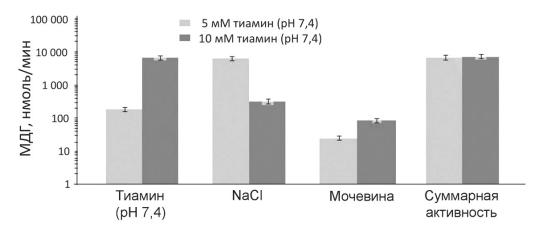
Б	Удельная актин	вность ГДГ	Общая акти	ивность ГДГ	H FHE
Белковая фракция	нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	Число пептидов ГДГ
	Первая стадия	я элюции: 10	мМ тиамин, ј	оН 7,4	
Ацетоновый экстракт	19 ± 2	100	$780 \pm 60$	100	8
10 мМ тиамин	$12 \pm 2$	64	$300 \pm 50$	39	1
1 M NaCl	$14 \pm 4$	75	$36 \pm 2$	5	1
2 М мочевина	2 ± 1	11	5 ± 1	2	4
	Первая стадия	я элюции: 10	мМ тиамин, ј	оН 5,6	
Ацетоновый экстракт	14 ± 1	100	$600 \pm 50$	100	8
10 мМ тиамин	$6\pm2$	43	$150 \pm 50$	25	6
1 M NaCl	$16 \pm 5$	114	$80 \pm 30$	14	4
2 М мочевина	$21 \pm 6$	150	$230 \pm 70$	39	6

Примечание. Активность ГДГ определяли после замены элюирующего раствора на 10 мM Tris-HCl (pH 7,4) при насыщении субстратами в среде следующего состава: 100 мM Tris-HCl, pH 7,5, 2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мM NH<sub>4</sub>Cl. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах.

ным раствором тиамина, содержит значительно меньшее количество ГДГ (обнаруживается лишь один характерный пептид ГДГ), чем аналогичная фракция, полученная в ходе элюции кислым раствором тиамина (шесть пептидов ГДГ) (табл. 1). Таким образом, аффинная элюция белка ГДГ с тиамин-сефарозы значительно эффективнее происходит при рН 5,6, чем при рН 7,4, однако удельная и общая активности ГДГ, элюируемой тиамином с тиамин-сефарозы, выше после элюции при рН 7,4, чем при рН 5,6 (табл. 1).

В табл. 2 представлено аналогичное сравнение активности и числа пептидов изоферментов МДГ при аффинной хроматографии с тиаминсефарозы. Следует учесть, что малатдегидрогеназная реакция катализируется цитоплазматическим (МДГ1) и митохондриальным (МДГ2) изоферментами, на которые тиамин влияет поразному [6]. Элюция кислым (рН 5,6) раствором тиамина в значительной степени снижает скорость малатдегидрогеназной реакции. В этих условиях активность МДГ во фракции, полученной в ходе аффинной элюции тиамином, составляет < 10% от общей активности МДГ, нанесенной на тиамин-сефарозу, тогда как при элюции слабощелочным раствором тиамина наблюдается существенное (1,5-2,5-кратное) повышение как удельной, так и общей активности МДГ в элюате по сравнению с исходными значениями. Тем не менее данные масс-спектрометрии элюированных тиамином фракций показывают, что кислый раствор тиамина преимущественно элюирует с тиамин-сефарозы МДГ2, а слабощелочной раствор — МДГ1 (табл. 2). Соответственно, МДГ1 элюируется NaCl и мочевиной только в том случае, когда ее аффинная элюция тиамином не была эффективной, т.е. при рН 5,6. Напротив, МДГ2 элюируется NaCl и мочевиной после аффинной элюции тиамином при обоих значениях рН. Таким образом, при рН 7,4 раствор тиамина элюирует с тиамин-сефарозы практически всю МДГ1, тогда как при рН 5,6 элюция раствором тиамина эффективна лишь в отношении МДГ2 (табл. 2). Зависимость профилей элюции изоферментов МДГ с тиамин-сефарозы от рН аффинной элюции тиамином согласуется с разной чувствительностью структуры и функции данных изоферментов к изменениям рН [20, 21]. Повышение концентрации тиамина при аффинной элюции приводит к увеличению активности МДГ в полученной на этой стадии фракции и, как следствие, к снижению активности МДГ при последующей элюции раствором NaCl (рис. 1). Данный результат свидетельствует о специфичности тиамина, а не только кислого значения рН, в качестве элюирующего фактора. Однако суммарная активность МДГ во фракции, элюируемой мочевиной, не зависит от концентрации тиамина на первой стадии элюции (рис. 1). Это свидетельствует об ином типе связывания с тиаминсефарозой изоферментов МДГ, элюируемых мочевиной (преимущественно МДГ2, табл. 2), по сравнению с изоферментами МДГ, элюируемыми тиамином и NaCl.

Известно, что ГДГ и МДГ2 взаимодействуют с образованием комплекса, имеющего существенное функциональное значение, в т.ч. для действия низкомолекулярных регуляторов на активность обоих ферментов [22—24]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образование такого комплекса может стабилизировать активность ГДГ при элюции с тиамин-



**Рис. 1.** Зависимость общей активности малатдегидрогеназы (МДГ) во фракциях, получаемых при аффинной хроматографии синаптосомальной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе, от концентрации тиамина в элюирующем растворе (рН 7,4) на первой стадии элюции. Усреднены результаты не менее двух независимых хроматографий при элюции 5 и 10 мМ тиамином

**Таблица 2.** Активность малатдегидрогеназы (МДГ) и уникальные для цитоплазматического (МДГ1) и митохондриального (МДГ2) изоферментов пептиды в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка

Farmana dinamina	Удельная активность МДГ		Общая активность МДГ		Число пептидов МДГ				
Белковая фракция	нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин %		МДГ1	МДГ2			
Первая стадия элюции: 10 мМ тиамин, рН 7,4									
Ацетоновый экстракт	190 ± 10	100	$8000 \pm 400$	100	2	3			
10 мМ тиамин	$460 \pm 5$	280	$11\ 900 \pm 100$	150	2	1			
1 M NaCl	$350 \pm 130$	210	$890 \pm 340$	11	0	2			
2 M мочевина	$60 \pm 20$	36	$150 \pm 50$	2	0	2			
	Первая стаді	ия элюции: 10	мМ тиамин,	рН 5,6					
Ацетоновый экстракт	$160 \pm 3$	100	$6600 \pm 300$	100	2	3			
10 мМ тиамин	16 ± 1	10	$390 \pm 20$	6	0	4			
1 M NaCl	$30 \pm 6$	20	$170 \pm 30$	3	3	5			
2 M мочевина	$30 \pm 5$	18	$30 \pm 5$	1	1	5			

Примечание. Активность МДГ определяли после замены элюирующего раствора на 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) при насыщении субстратами в среде следующего состава: 20 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,2), 0,3 мМ оксалоацетат, 0,14 мМ NADH. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах.

сефарозы NaCl и мочевиной. Так, общая и удельная активность ГДГ в данных фракциях выше при повышенном содержании МДГ2, которое наблюдается после проведения первой стадии элюции при рН 5,6 (табл. 1 и 2). Опосредованное ГДГ взаимодействие МДГ2 с тиаминсефарозой может определять коэлюцию данных ферментов мочевиной и иной характер взаимодействия с носителем МДГ2, элюируемой с тиамин-сефарозы мочевиной (рис. 1).

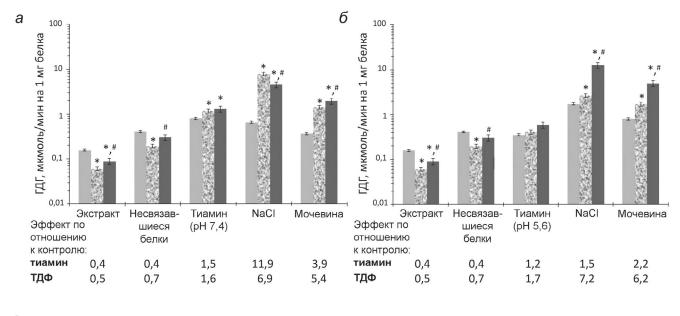
Аффинная хроматография на тиамин-сефарозе гомогенатов коры мозга крысы. О зависимости элюируемых с тиамин-сефарозы активностей ГДГ и МДГ от белкового состава анализируемой фракции свидетельствует и разница профилей элюции этих активностей при нанесении на тиамин-сефарозу разных препаратов белков мозга. Так, по сравнению с активностями ГДГ и МДГ в синаптосомальной фракции белков мозга, в элюате раствором тиамина (рН 7,4) данной фракции с тиамин-сефарозы удельная активность ГДГ падала (табл. 1), а МДГ – возрастала более чем в 2 раза (табл. 2). Напротив, по сравнению с активностями ГДГ и МДГ в гомогенате мозга, аффинная элюция данного препарата с тиамин-сефарозы слабощелочным раствором тиамина приводила к значительному (в 3 раза) увеличению удельной активности ГДГ при небольшом росте малатдегидрогеназной активности (с 8 до 11 нмоль/мин на 1 мг белка) (табл. 3). Кроме того, максимальная элюция

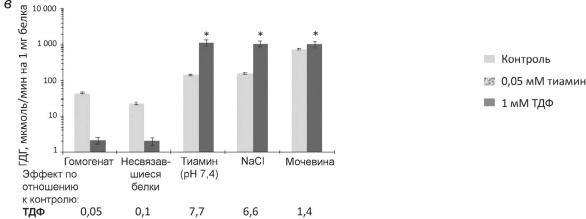
ГДГ и МДГ2 при хроматографии гомогенатов мозга наблюдалась под действием NaCl (9 пептидов ГДГ и 3 пептида МДГ2), причем именно в данной фракции удельные активности этих взаимодействующих между собой ферментов были наиболее высокими (табл. 3). Данные особенности элюции зависели от типа наносимой на тиамин-сефарозу белковой фракции. Так, при аффинной хроматографии синаптосомальной фракции мозга быка в аналогичных условиях, т.е. после аффинной элюции тиамином при рН 7,4, ГДГ лучше всего элюировалась мочевиной (табл. 1), а МДГ2 хорошо отделялась от МДГ1 (табл. 2). Таким образом, как взаимодействие ГДГ и/или изоферментов МДГ с тиаминсефарозой, так и коэлюция ГДГ с МДГ2 могут существенно зависеть от состава образца, подвергаемого аффинной хроматографии, отличающегося наборами белков и их низкомолекулярных лигандов.

Регуляция активности ГДГ и МДГ тиаминовыми соединениями *in vitro*. Влияние тиаминовых соединений на ГДГ и МДГ исследовали с учетом полученных ранее данных о действующих концентрациях и условиях максимизации влияния этих соединений на исследуемые ферменты [6]. В сравнительных экспериментах использовали фиксированные концентрации тиамина (0,05 мМ) и ТДФ (1 мМ), соотношение которых имитирует таковое *in vivo*. На рис. 2 показано влияние тиамина и/или ТДФ на актив-

ность ГДГ мозга в исходных препаратах и в элюатах с тиамин-сефарозы. Видно, что в исходных препаратах тиамин и ТДФ ингибируют активность ГДГ, тогда как после хроматографии наблюдается активация фермента данными соединениями. Аналогичную разницу в воздействии ТДФ на ГДГ наблюдали ранее в условиях насыщения субстратами очищенного фермента (1,2-кратная активация ТДФ) и фермента в составе митохондриального экстракта (1,3-кратное ингибирование ТДФ) [6]. Значительно более выраженное влияние ТДФ на активность ГДГ, обна-

руженное в данной работе при аффинной хроматографии препаратов мозга (рис. 2), свидетельствует о роли концентрации белка и/или содержащихся в исходных препаратах ГДГ мозга эндогенных факторов, удаляемых в ходе аффинной хроматографии, в регуляции активности фермента под действием ТДФ. Например, можно ожидать, что содержание ADP — активатора ГДГ — существенно выше в гомогенате мозга, чем в ацетоновом экстракте синаптосомальной фракции мозга. Как видно из рис. 3, ТДФ препятствует активации ГДГ под действием ADP.

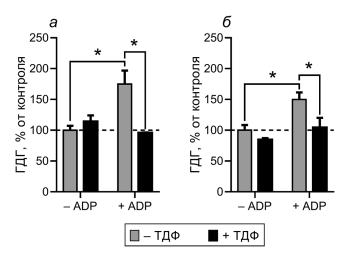




**Рис. 2.** Влияние тиамина и/или тиаминдифосфата (ТДФ) на активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) из мозга быка или крысы в элюатах с тиамин-сефарозы. При аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка на первой стадии элюции применяли 10 мM раствор тиамина, pH 7,4 (a) или pH 5,6 ( $\delta$ ); s — при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы на первой стадии элюции применяли 10 мM раствор тиамина, pH 7,4. Во всех случаях элюированные белки переводили в 10 мM Tris-HCl (pH 7,4) с помощью ультрафильтрации. Эффекты тиамина и ТДФ измеряли при ненасыщающей концентрации NADH в среде следующего состава: 100 мM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 мM 2-оксоглутарат, 0,02 мM NADH, 50 мM NH $_4$ Cl. Приведены усредненные результаты по 2-4 независимым экспериментам; \*, # p < 0,05 (достоверные отличия от контрольной активности и от активности в присутствии 0,05 мM тиамина соответственно, согласно t-тесту Стьюдента)

Таким образом, ингибирующее действие ТДФ в подвергаемых аффинной хроматографии препаратах может быть связано с выраженностью активирующего влияния ADP на ГДГ. Меньшее ингибирование фермента в составе синаптосомальной фракции мозга ТД $\Phi$  (рис. 2, a) соответствует ожидаемому снижению содержания ADP в данном препарате по сравнению с полным гомогенатом мозга, в котором влияние ТДФ на активность ГДГ существенно более выражено (рис. 2, в). С другой стороны, активация ТДФ после аффинной хроматографии могла бы быть связана с облегченной диссоциацией GTP – высокоэффективного ингибитора ГДГ. Однако в модельных экспериментах с очищенной ГДГ нами не было выявлено снижение ингибирования фермента GTP под действием ТДФ или тиамина в использованном интервале условий (до 1 мМ ТДФ или тиамина при 1 мкМ GTP и варьировании концентрации 2-оксоглутарата в интервале 0,1-10,0 мМ). Помимо влияния эндогенных регуляторов, при интерпретации результатов разных воздействий ТДФ на активность ГДГ синаптосом и гомогената мозга (рис. 2) нельзя исключить и разницу регуляции синаптосомальной и общей ГДГ мозга тиаминовыми соединениями – например, за счет специфических для синаптосом посттрансляционных модификаций или альтернативного сплайсинга фер-

Следует отметить, что при меньшем ингибирующем эффекте ТДФ в исходном препарате ГДГ меньшей оказалась и активация ТДФ ГДГ, элюируемой раствором тиамина, рН 7,4 (рис. 2). Так, в частично очищенном препарате из мозга



**Рис. 3.** Взаимозависимость влияния тиаминдифосфата (ТДФ) и ADP на активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Активность измеряли в буфере Кребса—Рингера (рН 7,4) в условиях насыщения субстратами (2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl). ADP и ТДФ использовали в концентрациях 1,7 и 1 мМ соответственно. Эксперименты проводили с коммерческим препаратом фермента, очищенного из печени быка (a), и частично очищенным ферментом из мозга крысы ( $\delta$ ). \* p < 0,05 (достоверные отличия согласно двухфакторному дисперсионному анализу с *post hoc*-тестом Сидака)

быка наблюдается 2-кратное ингибирование ГДГ под действием ТДФ, которое сменяется 1,5-кратной активацией в элюате раствором тиамина, рН 7,4 (рис. 2, a). В то же время в гомогенате коры мозга крысы добавление ТДФ приводит к 20-кратному ингибированию ГДГ, а при аффинной элюции белков данного препарата тиамином (рН 7,4) наблюдается 8-кратная активация

**Таблица 3.** Активность и уникальные пептиды глутаматдегидрогеназы (ГДГ), цитоплазматического (МДГ1) и митохондриального (МДГ2) изоферментов малатдегидрогеназы (МДГ) в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы

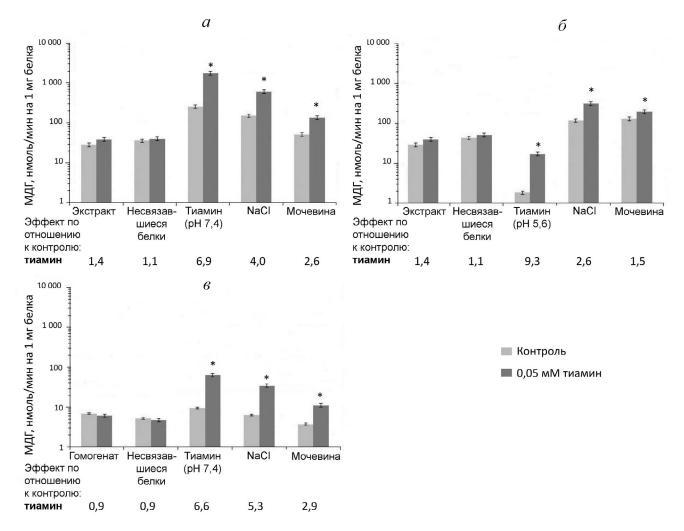
	ГДГ					МДГ					
Белковая фракция	удельная активность		общая активность		число	удельная активность		общая активность		число пептидов	
	нмоль/ мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	пептидов	нмоль/ мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	МДГ1	МДГ2
Гомогенат	5 ± 0	100	$4600 \pm 400$	100	н.о.	$8 \pm 0$	100	$7100 \pm 350$	100	н.о.	н.о.
10 мМ тиамин	$17 \pm 3$	340	$2900 \pm 500$	64	7	$11 \pm 1$	138	$1900 \pm 100$	26	1	1
1 M NaCl	19 ± 1	356	$1600 \pm 60$	34	9	$26 \pm 5$	325	$2200 \pm 400$	31	1	3
2 М мочевина	19 ± 5	370	$1300 \pm 260$	28	4	$15 \pm 5$	188	$1100 \pm 400$	15	1	1

Примечание. Активности ферментов определяли после замены элюирующего раствора на 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в средах следующего состава: для ГДГ - 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мМ NH $_4$ Cl; для МДГ - 20 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,2), 0,3 мМ оксалоацетат, 0,14 мМ NADH. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах; н.о. - не определяли.

ГДГ под действием ТДФ (рис. 2,  $\epsilon$ , гомогенат и тиамин, рН 7,4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллостерические эффекты ТДФ, как ингибирующий, так и активирующий, сильнее выражены в отношении ГДГ полного гомогената мозга крысы, чем в отношении ГДГ после ацетоновой экстракции синаптосомальной фракции мозга быка (рис. 2).

Из рис. 2 также видно, что при хроматографии ацетонового экстракта активирующий эффект ТДФ на ГДГ значительно выше после элюции NaCl и мочевиной (5—7-кратная активация) по сравнению с эффектом, наблюдающимся на стадии аффинной элюции тиамином (1,5—1,7-кратная активация). При этом в отсут-

ствие ТДФ уровень активности ГДГ, аффинно элюируемой тиамином, ниже уровня активированной ТДФ ГДГ (рис. 2). Таким образом, низкая активация данной фракции ГДГ ТДФ не может быть обусловлена активированным состоянием элюированной тиамином ГДГ за счет прочного связывания тиамина ферментом. Аналогичный (1,2-кратный) уровень активации фермента ТДФ в условиях насыщения ГДГ 2-оксоглутаратом и аммонием при низкой концентрации NADH наблюдали и ранее [6] при исследовании очищенного фермента или ГДГ в составе митохондриального экстракта. В отличие от аффинной хроматографии синаптосомальной фракции мозга, при хроматографии



**Рис. 4.** Влияние тиамина (0,05 мM) на малатдегидрогеназную активность  $(\text{МД}\Gamma)$  мозга быка и крысы в элюатах с тиаминсефарозы. При аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка на первой стадии элюции применяли 10 мM раствор тиамина, pH 7,4 (a) или pH 5,6 ( $\delta$ ); s — при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы на первой стадии элюции применяли 10 мM раствор тиамина, pH 7,4. Во всех случаях элюированные белки переводили в 10 мM Tris-HCl (pH 7,4) с помощью ультрафильтрации. Эффект тиамина измеряли при ненасыщающей концентрации оксалоацетата в среде следующего состава: буфер Кребса—Рингера (pH 7,4), 0,01 мM оксалоацетат, 0,14 мM NADH. Приведены усредненные результаты по 2-5 независимым экспериментам; \* p < 0,05 (достоверные отличия активности в присутствии тиамина от контрольной активности согласно t-тесту Стьюдента)

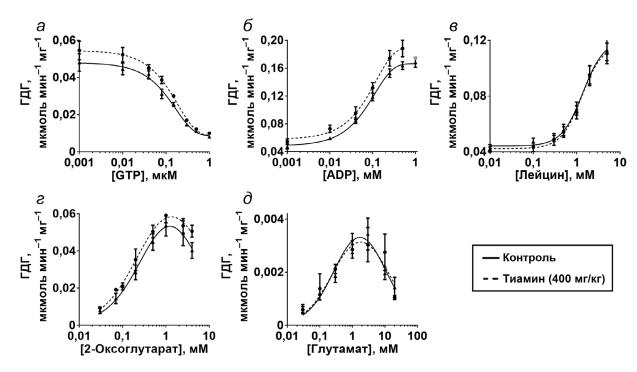
гомогената мозга максимальная (8-кратная) активация ТДФ ГДГ наблюдается именно во фракции, элюируемой тиамином (рис. 2,  $\theta$ ). Поскольку в этом случае тиамин элюирует подавляющую часть ГДГ (64% от общей активности в исходном препарате, табл. 1), можно заключить, что выраженный активирующий эффект ТДФ определяется концентрацией ГДГ и/или ее гетерологических комплексов. Исследование действия тиамина на ГДГ синаптосомальной фракции, элюируемую NaCl и мочевиной (рис.  $2, a, \delta$ ), подтверждает данное предположение. В отличие от действия ТДФ, которое не зависит от значения рН при предшествующей аффинной элюции тиамином, активация ГДГ тиамином в элюатах NaCl и мочевиной значительна (до 12-кратной) лишь после проведения элюции тиамином при pH 7,4 (рис. 2, a). В этих же условиях активность ГДГ, элюируемой NaCl и мочевиной, составляет значительно меньшую часть ее общей активности, чем после проведения аффинной элюции тиамином при рН 5,6. В последнем случае, как показано выше, в элюатах содержится больше МДГ2 (табл. 2). Одновременное присутствие в элюате ГДГ и МДГ2 создает лучшие условия для образования комплекса ГДГ и МДГ2. Тем не менее удельная и общая активности МДГ, а также активация МДГ тиамином в этом случае существенно ниже по сравнению с теми, что наблюдаются в элюатах NaCl и мочевиной после аффинной элюции тиамином при рН 7,4 (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что после хроматографии на тиамин-сефарозе активация ГДГ тиамином не выражена в условиях, способствующих образованию комплекса ГДГ с МДГ2, т.е. после аффинной элюции при рН 5,6. Напротив, активация ГДГ тиамином максимальна в условиях низкой общей активности ГДГ и пониженного содержания МДГ2 при элюции растворами NaCl и мочевины, т.е. после аффинной элюции при рН 7,4 (табл. 1 и 2). В связи с этим можно предположить, что тиамин, аналогично МДГ2, стабилизирует ГДГ в последующих элюатах с помощью NaCl и мочевины, способных вызывать частичную диссоциацию и/или денатурацию ГДГ.

Стимулирующее влияние тиамина на активность МДГ исследованных препаратов белков мозга характеризуется менее сложными закономерностями, чем действие тиамина на активность ГДГ. Тиамин не влияет на активность МДГ исходных препаратов. При хроматографии как синаптосомальной фракции мозга, так и гомогената мозга максимальное влияние тиамина на активность МДГ наблюдается во фракции, аффинно элюированной тиамином. При после-

дующей элюции NaCl и особенно мочевиной данный эффект тиамина значительно снижается (рис. 4). Очевидно, неспецифическая элюция растворами NaCl или мочевины приводит к частичной потере аллостерической регуляции МДГ под действием тиамина.

Отсутствие влияния тиамина на активность исходных препаратов МДГ может быть связано с ранее охарактеризованной разнонаправленностью действия тиамина (ингибирование МДГ1 и активация МДГ2) на данные изоферменты [6]. Действительно, из рис. 4, а и табл. 2 видно, что повышение активности МДГ тиамином максимально (9-кратное) во фракциях с преимущественным содержанием МДГ2 (после аффинной элюции кислым раствором тиамина, табл. 2), а коэлюция МДГ1 и МДГ2 (при элюции слабощелочным раствором тиамина, табл. 2) несколько снижает активацию МДГ тиамином (до 7-кратной). Таким образом, во фракции, содержащей обе изоформы фермента, активация тиамином МДГ2 может уменьшаться за счет ингибирования тиамином МДГ1 [6]. Однако следует также учесть, что, согласно измерению ферментативной активности, существенная часть МДГ не связывается с тиамин-сефарозой даже при нанесении на колонку значительно меньшего количества белка, содержащегося в ацетоновом экстракте синаптосом, по сравнению с полным гомогенатом мозга (рис. 4). Поэтому можно предположить, что с тиамин-сефарозой взаимодействуют лишь определенные изоформы МДГ1 и МДГ2 — например, отличающиеся уровнем посттрансляционных модификаций.

Исследование влияния высоких доз вводимого крысам тиамина на регуляторные свойства ГДГ и МДГ в составе гомогенатов мозга. Как показано выше, регуляция активности ферментов тиамином и его производными может отличаться в зависимости от препарата фермента (рис. 2 и 4) [6]. Так, в гомогенатах или синаптосомальной фракции мозга ГДГ ингибируется тиамином, а на МДГ тиамин не оказывает влияния. Однако после аффинной хроматографии наблюдается активация ГДГ и МДГ (рис. 2 и 4), причем скорость катализируемой МДГ реакции растет даже в тех случаях, когда в препарате присутствуют оба изофермента МДГ (табл. 1 и 3), один из которых (МДГ1) ингибируется тиамином [6]. Ввиду такой неоднозначности регуляции тиаминовыми соединениями *in vitro* мы оценили ее биологическое значение путем исследования регуляторных свойств ферментов мозга крысы после введения животным высокой дозы тиамина. Для этого содержащие ГДГ и МДГ гомогенаты коры мозга экспериментальных и контрольных крыс



**Рис. 5.** Влияние введения животным тиамина (400 мг/кг) на регуляторные свойства глутаматдегидрогеназы (ГДГ) мозга крысы. Исследована зависимость активности фермента от аллостерических регуляторов: GTP (a), ADP ( $\delta$ ), лейцина ( $\epsilon$ ) и субстратов 2-оксоглутарата ( $\epsilon$ ) и глутамата ( $\delta$ ). Для построения кинетических зависимостей усреднены данные трех независимых экспериментов. Аппроксимации проводили в программе GraphPad Prism v. 8.0 с использованием встроенных моделей (см. разд. «Методы исследования»). Параметры аппроксимаций приведены в табл. 4

были освобождены от низкомолекулярных лигандов путем быстрой гель-фильтрации, не приводящей к существенному разведению гомогената.

Кинетические зависимости активности ГДГ от ее основных низкомолекулярных регуляторов: аллостерических эффекторов, GTP, ADP и лейцина, а также субстратов разных направлений реакции, 2-оксоглутарата или глутамата, представлены на рис. 5. Сравнение кинетических кривых показывает, что введенный животным тиамин увеличивает амплитуду ингибирования GTP (рис. 5, a) и максимум эффективной скорости катализируемой ГДГ реакции, достигаемой в фазе активации фермента под действием ADP (рис. 5,  $\delta$ ) и 2-оксоглатурата (рис. 5,  $\epsilon$ ). При этом введение тиамина *in vivo* не меняет регуляцию ГДГ мозга лейцином (рис. 5,  $\theta$ ) и глутаматом (рис. 5,  $\partial$ ). Поэтому увеличение наблюдаемой амплитуды ответа ГДГ на GTP, ADP и 2-оксоглутарат не связано с ростом экспрессии фермента, что подтверждает и количественный анализ пептидов ГДГ, детектируемых в исследованных гомогенатах с помощью масс-спектрометрии. Следует отметить, что из указанных выше сопряженных изменений регуляции ГДГ после введения животным тиамина лишь изменение амплитуды ингибирования фермента под действием GTP показало статистическую достоверность (табл. 4). По-видимому, это связано со сложностью дифференциации приведенных зависимостей в случаях, когда активация сменяется ингибированием при высоких концентрациях ADP (после введения тиамина) и 2-оксоглутарата. Тем не менее характерные для насыщения 2-оксоглутаратом значения  $K_{\rm m}^{\rm O\Gamma}$  и  $K_{\rm i}^{\rm O\Gamma}$ (табл. 4) хорошо согласуются с наблюдаемым на рис. 5, г снижением субстратного ингибирования, а сопряженный характер данных изменений соответствует известной связи механизмов регуляции ГДГ с помощью GTP и ADP с субстратным ингибированием фермента [25]. Поскольку ряд остатков регуляторных центров ГДГ, включая остаток лизина в центре связывания GTP, подвергаются посттрансляционному ацилированию [25], можно предположить, что введение животным тиамина приводит к изменению регуляторных свойств ГДГ (рис. 5, табл. 4) за счет изменения уровня таких посттрансляционных модификаций. Например, конформационные изменения при связывании тиамина и/или его производных с ГДГ in vivo могут менять доступность тех или иных остатков фермента ацилированию или деацилированию.

Аналогичный анализ влияния высокой дозы тиамина на регуляторные свойства МДГ в со-

ставе гомогенатов мозга после гель-фильтрации не выявил существенных изменений в зависимостях скорости малатдегидрогеназной реакции от насыщения субстратами: оксалоацетатом (0,01-1,00 мM) и малатом (0,1-10,0 мM). Таким образом, если тиамин активирует лишь небольшую часть взаимодействующих с тиамин-сефарозой изоформ МДГ, то введение животным тиамина значительно не меняет представленность данных изоформ в гомогенате мозга.

Сравнительный анализ элюируемых с тиаминсефарозы протеомов. По сравнению с предыдущим использованием аффинной хроматографии на носителях, модифицированных тиамином или аналогом его функциональной (тиазолиевой) части, в данной работе применялась модификация носителя тиамином, исключающая разную конформацию и/или количество присоединенных к линкеру молекул «наживки». Для возможного повышения специфичности элюции с тиамин-содержащего носителя мы также использовали раствор тиамина в качестве аффинного элюента. Наконец, для определения дополнительных путей некоферментного действия тиамина, мишени которого могли теряться при очистке проанализированной ранее синаптосомальной фракции мозга крысы [6], мы подвергли аффинной хроматографии пол-

ный гомогенат мозга крысы. Биоинформатический анализ идентифицированных в данной работе совокупностей белков, элюируемых при хроматографии синаптосомальной фракции мозга быка или гомогената мозга крысы, представлен в табл. 5. Сравнение с предыдущими результатами аналогичного анализа тиамин-зависимых протеомов синаптосомальной фракции мозга крысы [6] показало, что введение аффинной элюции тиамином меняет относительную представленность терминов аннотации «фосфобелки» и «ацетилирование» в характеристике элюируемых с тиамин-сефарозы белков. В нашем предыдущем исследовании [6], в котором элюция тиамином белков синаптосомальной фракции мозга крысы не использовалась, термин «ацетилирование» имел существенно большую степень обогащения ( $P = 10^{-17}$ , согласно результатам анализа тиамин-связывающего протеома программой DAVID), чем термин «фосфобелки» ( $P = 10^{-6}$ ). При аффинной же элюции тиамином белков синаптосомальной фракции мозга быка оба термина характеризуются сходной степенью обогащения (Р =  $= 10^{-35} - 10^{-36}$ ), а в случае аффинной хроматографии полных гомогенатов мозга крысы термин «фосфобелки» даже приобретает большую значимость ( $P = 10^{-76}$ ), чем термин «ацетилирова-

Таблица 4. Кинетические параметры регуляции ГДГ мозга контрольных крыс и крыс после введения высокой дозы тиамина

Параметры	Контроль	Тиамин
$IC_{50}^{GTP}$ , MKM	$0,13 \pm 0,01$	$0.14 \pm 0.01$
Амплитуда ингибирования GTP, мкмоль/мин на мг	$0,042 \pm 0,003$	$0,048 \pm 0,003$
Коэффициент Хилла (GTP)	$-1,4 \pm 0,3$	$-1,3 \pm 0,2$
EC <sub>50</sub> <sup>ADP</sup> , MM	$0,09 \pm 0,01$	$0.11 \pm 0.07$
Амплитуда активации ADP, мкмоль/мин на мг	$0,12 \pm 0,01$	$0.17 \pm 0.04$
Коэффициент Хилла (ADP)	$1,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,4$
EC <sub>50</sub> <sup>Leu</sup> , MM	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
Амплитуда активации лейцином, мкмоль/мин на мг	$0.08 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$
Коэффициент Хилла (лейцин)	$1.8 \pm 0.6$	$1.8 \pm 0.6$
$V_{ m max}^{ m O\Gamma}$ , мкмоль/мин на мг	$0.08 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.01$
$K_{\mathrm{m}}^{\mathrm{OF}}$ , mM	$0,36 \pm 0,16$	$0,25 \pm 0,07$
$K_{i}^{\text{OF}}$ , mM	$4,2 \pm 2,4$	$7,1 \pm 3,1$
$V_{ m max}^{ m Glu}$ , мкмоль/мин на мг	$0,005 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$
$K_{ m m}^{ m Glu}$ , mM	$0,33 \pm 0,16$	$0,26 \pm 0,13$
$K_{\rm i}^{ m Glu},{ m MM}$	$9.0 \pm 4.5$	$12.7 \pm 6.8$

Примечание. Представлены результаты нелинейной регрессии в программе GraphPad Prism v. 8.0 (см. «Методы исследования») кинетических зависимостей, приведенных на рис. 5. Верхние индексы параметров насыщения ГДГ указывают лиганд, в случае 2-оксоглутарата — ОГ. Жирным шрифтом выделены определенные с помощью *F*-критерия достоверные отличия между кинетическими параметрами аппроксимированных зависимостей ГДГ из мозга крыс контрольной группы и крыс, которым вводили тиамин.

**Таблица 5.** Главные термины аннотации протеомов, элюируемых с тиамин-сефарозы тиамином или неспецифическими агентами (NaCl и мочевиной)

Элюці	ия тиамином		Элюция NaCl + мочевиной				
термин аннотации	число белков	<i>P</i> обогащения	термин аннотации	число белков	<i>Р</i> обогащения		
Бы	K (n = 115)		Бык (n = 136)				
1) Фосфобелки	83	2,0E-39	1) Фосфобелки	96	1,3E-46		
2) Ацетилирование	68	3,6E-38	2) Кератин	25	1,4E-36		
3) Кератин	23	6,5E-34	3) Промежуточные филаменты	26	4,5E-35		
4) Цитоплазма	56	1,1E-23	4) Ацетилирование	69	1,3E-34		
5) Метилирование	25	5,2E-17	5) Цитоплазма	62	2,3E-25		
			6) Метилирование	23	1,8E-13		
Крыса (n = 183)			Крыса (n = 202)				
1) Фосфобелки	153	6,5E-76	1) Фосфобелки	173	1,0E-82		
2) Ацетилирование	105	3,4E-61	2) Ацетилирование	120	2,9E-69		
3) Метилирование	48	7,2E-34	3) Метилирование	58	1,9E-42		
4) Цитоплазма	84	3,9E-29	4) Цитоплазма	95	5,9E-32		

Примечание. Показаны репрезентативные результаты биоинформатического анализа с помощью программы DAVID (v. 6.8) наборов белков, элюируемых при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка (два независимых определения) и полных гомогенатов коры мозга крысы (три независимых определения); n — общее количество белков в анализируемых протеомах; P обогащения — значение P, характеризующее вероятность встречаемости соответствующего термина аннотации в анализируемой выборке из n белков по сравнению со случайной встречаемостью данного термина в соответствующем геноме.

ние» ( $P = 10^{-61}$ ) (табл. 5). Тем не менее о специфичности термина «ацетилирование» в качестве характеристики тиамин-зависимого протеома синаптосом мозга быка говорит сравнение представленности основных терминов белковой аннотации на аффинной и неспецифических стадиях элюции. В элюате синаптосомальной фракции мозга быка раствором тиамина термины «фосфобелки» и «ацетилирование» обогащены одинаково ( $P = 10^{-35} - 10^{-36}$ ), тогда как в элюатах неспецифическими агентами (NaCl и мочевина) относительное обогащение термина «ацетилирование» снижается со второй до четвертой позиции при росте обогащения термина «фосфобелки» ( $P = 10^{-46}$ ). Таким образом, по сравнению с элюцией неспецифическими агентами, аффинная элюция тиамином связавшихся с тиамин-сефарозой синаптосомальных белков увеличила относительную представленность белков, аннотируемых как «фосфобелки», подтвердив специфичность термина «ацетилирование» в качестве характеристики данного протеома. Оба термина характеризуют тиамин-зависимые протеомы мозга независимо от вида использованного животного (бык или крыса) или препарата, подвергаемого аффинной хроматографии (синаптосомальная фракция или гомогенат мозга) (табл. 5) [6]. Биоинформатический анализ с помощью программы DAVID v. 6.8 (табл. 5) также показал, что удерживаемые на тиамин-сефарозе белки ацетонового экстракта синаптосом мозга быка значительно реже аннотируются термином «метилирование» (позиции 5 и 6), чем аналогичные белки полного гомогената коры мозга крысы (позиция 3). С учетом того, что термин «метилирование» не был значительно представлен и при предыдущем анализе тиамин-зависимых протеомов синаптосомальной фракции мозга крысы [6], можно заключить, что обогащение данного термина связано не с видоспецифическими эффектами, а с удалением при очистке синаптосомальной фракции группы взаимодействующих с тиамином белков, характеризующихся функциональным термином «метилирование».

Представленное сравнение взаимодействия с тиамин-сефарозой как различных фракций белков мозга (полный гомогенат и ацетоновый экстракт синаптосом), так и различных видов животных (бык и крыса) указывает на универсальность регуляции тиаминовыми соединениями таких ферментов центрального метаболизма мозга животных, как дегидрогеназы малата и глутамата. Биологическое значение регулятор-

ного действия тиамина и/или ТДФ подтверждено изменением регуляторных свойств ГДГ мозга крыс после введения животным высоких доз тиамина. Биоинформатический анализ наборов белков, элюируемых с тиамин-сефарозы в разных условиях, указывает на специфичность их обогащения термином «ацетилирование» и вовлеченность таких белков в процессы метилирования.

Финансирование. Работа О.А. Меженской, аспирантки Института биохимии им. А.В. Палладина НАНУ (Киев, Украина) (экспериментальные результаты, представленные на рис. 1, 2, 4 и в табл. 1—3 за исключением данных массспектрометрии), по данному проекту, выполняемому в МГУ им. М. В. Ломоносова, была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-34-50124) в числе работ, проводимых молодыми учеными под руководством кандидатов и докторов наук в научных организациях Российской Федерации. Эксперименты, представленные на рис. 3 и 5, анализ

(в т.ч. биоинформатический) результатов аффинной хроматографии в сочетании с данными масс-спектрометрии и подготовка публикации к печати проведены в рамках выполнения проекта, финансируемого Российским научным фондом (грант № 18-14-00116).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность к.б.н. А.В. Граф и к.б.н. М.В. Масловой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление образцов мозга крыс, использованных в данном исследовании.

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

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Frank, L.L. (2015) Thiamin in clinical practice, *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 39, 503–520, doi: 10.1177/0148607114565245.
- Tylicki, A., Lotowski, Z., Siemieniuk, M., and Ratkiewicz, A. (2018) Thiamine and selected thiamine antivitamins biological activity and methods of synthesis, *Biosci. Rep.*, 38, BSR20171148, doi: 10.1042/BSR20171148.
- 3. Pavlovic, D.M. (2019) Thiamine deficiency and benfotiamine therapy in brain diseases, *Am. J. Biomed. Sci. Res.*, 3, 1–5, doi: 10.34297/AJBSR.2019.03.000621.
- Bunik, V.I., and Aleshin, V.A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin (vitamin B1), *Studies in Natural Products Chemistry*, 53, 375–429, doi: 10.1016/B978-0-444-63930-1.00011-9.
- Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., and Bunik, V.I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical implications, *Biochemistry (Moscow)*, 84, 1051–1075, doi: 10.1134/S0006297919080017.
- Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Luigi Di Salvo, M., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, 5, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
- Tsepkova, P.M., Artiukhov, A.V., Boyko, A.I., Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., Zvyagintseva, M.A., Ryabov, S.I., Ksenofontov, A.L., Baratova, L.A., Graf, A.V., and Bunik, V.I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, 82, 723–736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
- 8. He, X., and Zhang, J. (2006) Toward a molecular understanding of pleiotropy, *Genetics*, **173**, 1885–1891, doi: 10.1534/genetics.106.060269.

- 9. Morales-Gonzalez, J.A., Madrigal-Santillan, E., Morales-Gonzalez, A., Bautista, M., Gayosso-Islas, E., and Sanchez-Moreno, C. (2015) What is known regarding the participation of factor Nrf-2 in liver regeneration? *Cells*, **4**, 169–177, doi: 10.3390/cells4020169.
- Muller, S. (2017) DNA damage-inducing compounds: unraveling their pleiotropic effects using high throughput sequencing, *Curr. Med. Chem.*, 24, 1558–1585, doi: 10.2174/0929867324666170124143710.
- Leeuw, E.P.H., Lee, S.H., Kim, W.H., Kwasny, S.M., Opperman, T.J., and Lillehoj, H.S. (2018) Pleiotropic antiinfective effects of defensin-derived antimicrobial compounds, *Avian Dis.*, 62, 381–387, doi: 10.1637/11912-061118-Reg.1.
- 12. Gomes, M.B., and Negrato, C.A. (2014) Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases, *Diabetol. Metab. Syndr.*, **6**, 80, doi: 10.1186/1758-5996-6-80.
- 13. Turner, P.V., Pekow, C., Vasbinder, M.A., and Brabb, T. (2011) Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 50, 614–627.
- 14. Postoyenko, V.A., Parkhomenko, Y.M., Vovk, A.I., Khalmuradov, A.G., and Donchenko, G.V. (1987) Isolation and some properties of thiamine-binding protein from the rat brain synaptosomes, *Biokhimiia*, **52**, 1792–1797.
- Graf, A., Kabysheva, M., Klimuk, E., Trofimova, L., Dunaeva, T., Zundorf, G., Kahlert, S., Reiser, G., Storozhevykh, T., Pinelis, V., Sokolova, N., and Bunik, V. (2009) Role of 2-oxoglutarate dehydrogenase in brain pathologies involving glutamate neurotoxicity, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 61, 80–87, doi: 10.1016/j.molcatb.2009.02.016.
- Klyashchitsky, B.A., Pozdney, V.F., Mitina, V.K., Voskoboev, A.I., and Chernikevich, I.P. (1980) Isolation and purification of biopolymers by biospecific affinity

- chromatography. V. Affinity chromatography of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **6**, 1572–1579.
- 17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Bunik, V., Kaehne, T., Degtyarev, D., Shcherbakova, T., and Reiser, G. (2008) Novel isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart, *FEBS J.*, 275, 4990–5006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06632.x.
- MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., and MacCoss, M.J. (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments, *Bioinformatics*, 26, 966–968, doi: 10.1093/bioinformatics/btq054.
- Wood, D.C., Jurgensen, S.R., Geesin, J.C., and Harrison, J.H. (1981) Subunit interactions in mitochondrial malate dehydrogenase. Kinetics and mechanism of reassociation, *J. Biol. Chem.*, 256, 2377–2382.

- 21. Bleile, D.M., Schulz, R.A., Harrison, J.H., and Gregory, E.M. (1977) Investigation of the subunit interactions in malate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 755–758.
- Fahien, L.A., Kmiotek, E., and Smith, L. (1979) Glutamate dehydrogenase—malate dehydrogenase complex, Arch. Biochem. Biophys., 192, 33–46, doi: 10.1016/0003-9861(79)90069-9.
- 23. Fahien, L.A., Kmiotek, E.H., MacDonald, M.J., Fibich, B., and Mandic, M. (1988) Regulation of malate dehydrogenase activity by glutamate, citrate, alpha-ketoglutarate, and multienzyme interaction, *J. Biol. Chem.*, **263**, 10687–10697.
- 24. Fahien, L.A., MacDonald, M.J., Teller, J.K., Fibich, B., and Fahien, C.M. (1989) Kinetic advantages of heteroenzyme complexes with glutamate dehydrogenase and the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, **264**, 12303–12312.
- Bunik, V., Artiukhov, A., Aleshin, V., and Mkrtchyan, G. (2016) Multiple forms of glutamate dehydrogenase in animals: structural determinants and physiological implications, *Biology (Basel)*, 5, 53, doi: 10.3390/biology5040053.

# REGULATION OF MALATE DEHYDROGENASES AND GLUTAMATE DEHYDROGENASE OF MAMMALIAN BRAIN BY THIAMINE in vitro AND in vivo\*

O. A. Mezhenska<sup>1</sup>, V. A. Aleshin<sup>2,3</sup>, T. Kaehne<sup>4</sup>, A. V. Artiukhov<sup>2,3</sup>, and V. I. Bunik<sup>2,3\*\*,\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Vitamin and Coenzyme Biochemistry, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 01601 Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bunik@belozersky.msu.ru

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 19991 Moscow, Russia
 Institute of Experimental Internal Medicine, Otto-von-Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

Received August 5, 2019 Revised September 24, 2019 Accepted September 24, 2019

To study the mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine and its diphosphate (ThDP) on brain proteins, an acetone extract of bovine brain synaptosomes or homogenate of rat brain cortex are subjected to affinity chromatography on thiamine-modified Sepharose. Relative content of glutamate dehydrogenase (GDH) and isoenzymes of malate dehydrogenase (MDH) in step-wise eluates by thiamine (at pH 7.4 or 5.6), NaCl and urea is determined by mass-spectrometry. Influence of thiamine and/or ThDP on GDH and MDH activities in these eluates is studied as well. Activation of malate dehydrogenase reaction by thiamine is maximal after elution of proteins with an acidic thiamine solution that does not elute an MDH1 isoenzyme. Effects of exogenous thiamine or ThDP on GDH activity probably depend on the presence of endogenous regulators of the enzyme. In fact, thiamine and/or ThDP activate the brain GDH in cluates but inhibits the enzyme in crude preparations applied to the sorbent. ThDP inhibits the ADPactivated GDH. Activation of GDH by thiamine (but not ThDP) decreases in case when the acidic thiamine solution (pH 5.6) is used as eluent compared to the procedure employing slightly alkaline thiamine solution (pH 7.4). Simultaneous increase in the MDH2 content and in total GDH activity after the affinity elution at pH 5.6 compared to the elution at pH 7.4 indicates the role of the known GDH–MDH2 interaction in stabilizing the GDH activity and in GDH regulation by thiamine. The biological potential of thiamine-dependent regulation of the brain GDH is confirmed in vivo by demonstration of changes in regulatory properties of GDH after administration of a high dose of thiamine to rats. Bioinformatics analysis of the thiamine-eluted brain proteins shows specific enrichment of their annotation with terms «phosphoprotein», «acetylation» and «methylation». Relationship between thiamine and these posttranslational modifications in brain may contribute to neuroprotective effects of high doses of thiamine, including the regulation of oxidation of the major excitatory neurotransmitter in brain – glutamate.

Keywords: thiamine, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, thiamine-Sepharose, phosphoprotein, acetylation, methylation

УДК 577.121.7

# ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КИСЛОРОДУ

# Обзор

© 2020 А.Н. Вётош<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vjotnn@yahoo.com
<sup>2</sup> НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта, 190121 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 195067 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.05.2019 После доработки 29.09.2019 Принята к публикации 20.10.2019

На основании анализа данных литературы описаны молекулярные механизмы рецепции уровня кислорода в различных компартментах клеток животных. Показано, что внутриклеточная сенсорная трансдукция кислорода может осуществляться несколькими способами. Рассмотрены детали функционирования околомембранного и цитоплазматического пулов молекулярных конструктов клеток в условиях гипоксии. Обсуждаются сведения о роли митохондрий в процессах клеточной чувствительности к уменьшению содержания кислорода. Выявлены подробности взаимного влияния оперативных и хронических внутриклеточных механизмов восприятия отрицательных градиентов концентрации молекулярного кислорода и их связи с реакциями клеточного метаболизма на оксидативный стресс.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, калиевые мембранные каналы, НІГ.

**DOI:** 10.31857/S0320972520010042

Кислород — главный детерминант клеточного метаболизма аэробов. Отдельные клетки и их небольшие группы, инкубируемые в естественных или искусственных условиях, получают жизненно важные ингредиенты путем диффузии. В многоклеточных организмах в распределении атмосферного кислорода участвуют специализированные респираторные и циркуляторные транспортные системы.

Качество распределения кислорода не может не контролироваться на системном, регионарном и клеточном уровне. В последнем случае можно ожидать наличие специальных кислородных клеточных сенсоров или цитоцентрических механизмов, участвующих в управлении клеточным гомеостазом. Наибольшее количество данных о чувствительности клеток к вариациям содержания кислорода получено для клеточных элементов тахитрофных тканей в

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода;  $BK_{Ca}$  — кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости; CSE — цистатионин-гамма-лиаза; FIH — фактор, ингибирующий HIF; HO-2 — гемоксигеназа-2; HIF — фактор, индуцированный гипоксией; PHD — пролилгидроксилаза.

условиях перехода от нормоксии к гипоксии *in vitro*.

За последние 30 лет были намечены контуры описания физиологического кислородного гомеостаза клетки. Молекулярную платформу для исследований в этой области обеспечили работы Lopez-Barneo et al. [1] и Semenza et al. [2, 3]. Дальнейшие исследования данной проблемы позволят узнать закономерности пространственной динамики концентрации кислорода внутри клетки, предпочтительные «ворота входа», «воронки утилизации» и возможные «сайты депонирования»  $O_2$ .

#### **МИТОХОНДРИИ**

Молекулярный кислород является терминальным акцептором электронов в процессах продукции АТР в митохондриях [4–6]. Эти клеточные органеллы потребляют до 90% кислорода, поступающего к клеткам за счет диффузионного и конвективного массопереноса [5, 7, 8]. Названные обстоятельства многие годы сохраняли за митохондриями статус главной мишени

4 49

50 ВЁТОШ

в «охоте» исследователей за внутриклеточным кислородным сенсором [6, 9, 10].

Большинство авторов, ставивших себе целью обосновать исходную точку в цепи регулирования внутриклеточного кислородного гомеостаза, по умолчанию искали гипоксический сенсор  $O_2$ . В качестве такового предполагалось обнаружить молекулярный агрегат или процесс, изменяющий свое состояние при уменьшении концентрации молекул кислорода. При этом изменение состояния «предполагаемого сенсора» должно было иметь значимые для функционирования и судьбы клетки последствия.

Ожидаемый на первый взгляд механизм кислородной рецепции предполагали найти в конечных точках поступления кислорода в клетки. Надеялись, что он будет основан на учете запаса АТР. Если объем этого запаса приблизится к минимально допустимому значению, должен включиться режим «тревоги», и клетка запустит «гипоксический ответ». Вдохновляла умозрительная модель Atkinson [11] и предложенная им формула расчета энергетического заряда клетки. Однако до настоящего времени вышеизложенный механизм обнаружен не был, и в недавнем обзоре Waypa et al. [6] данный вариант сохранения нормального кислородного статуса клетки назван «слишком бедным инженерным решением».

В качестве критики АТР-зависимого механизма кислородной рецепции можно привести следующие доводы. Во-первых, кроме кислорода для синтеза АТР требуются различные органические субстраты. Следовательно, количество АТР отражает не только адекватную доставку кислорода. Во-вторых, совершенно не ясно как отдельная митохондрия и весь митохондриальный пул клетки в целом могут повлиять на диффузионный массоперенос кислорода в экстрацеллюлярной и цитозольной зонах? В-третьих, по данным прямых измерений содержания кислорода в клетках, продукция АТР сохраняется вплоть до достижения аноксического порога (2 торр, т.е. 2 мм рт. ст.) [12, 13]. Следовательно, ориентация на измерение запаса АТР не обеспечит детектирование поступления кислорода в диапазоне физиологической гипоксии [6].

Отсутствие положительных ответов на эти вопросы, а также безуспешные 40-летние поиски ATP-зависимого механизма кислородной внутриклеточной рецепции приводят к выводу о том, что митохондрии, если они и вовлечены в процессы регулирования клеточного кислородного гомеостаза, делают это каким-то иным способом.

Определенный интерес в связи с этим вызывают процессы окисления тиолов перекисью водорода. Однако осторожные в суждениях авторы

обзоров по этой теме считают, что кислородная чувствительность этапов взаимодействия  $H_2O_2$  и тиолсодержащих молекул, в частности глутатиона, глутаредоксинов, тиоредоксинов и пероксиредоксинов является скорее свидетельством оптимизации хрупкого баланса этого альянса, чем кислородной внутриклеточной сенсорной трансдукции [14–16].

Еще один вариант участия митохондрий в формировании «гипоксического ответа» клетки может быть основан на сигнальной роли активных форм кислорода (АФК), продуцируемых группой ферментов цепи окислительного фосфорилирования [4, 5, 17–19]. Давно известно, что при поступлении избытка кислорода в клетки продукция АФК увеличивается [20, 21]. В исследованиях прошлых лет отмечалось уменьшение продукции прооксидантов на фоне гипоксических воздействий [22, 23]. Однако с некоторых пор в работах группы авторов появились данные об увеличении продукции одного из видов АФК — перекиси водорода — митохондриями кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток легочной артерии в условиях гипоксии [24–26]. Их выводы основывались на результатах нескольких лабораторий, где различными методами изучали процессы внутриклеточного распределения АФК при пониженном содержании кислорода [27-29].

Экспериментально обосновано, что АФК помимо прооксидантных обладают и регуляторными функциями в широком диапазоне клеточных ответов, включая пролиферацию, дифференцировку, старение клеток, регуляцию транскрипционных факторов и воспалительную реакцию [19, 30, 31]. Было сделано предположение о возможном участии прооксидантов, в частности  $H_2O_2$ , в механизмах регулирования внутриклеточного кислородного гомеостаза [32, 33]. В основу доказательной базы легли результаты прямого измерения динамики концентрации АФК с помощью тиолового редокс-сенсора roGFP в гладкомышечных клетках легочной артерии [34]. В условиях нормоксии го GFP был активирован присутствием молекул перекиси водорода в цитозоле только на 20%, в межмембранном пространстве митохондрий – на 45% и в матриксе тех же органелл — на 70%. При гипоксии активация го GFP в цитозоле повышалась до 35%, в межмембранном пространстве – до 65%, а в матриксе митохондрий она заметно снижалась. Сходные изменения наблюдали [32] на изолированных артериальных гладкомышечных клетках. Это прямое подтверждение увеличения концентрации  $H_2O_2$  в цитозоле при гипоксии. Полученные Waypa et al. [6] результаты нашли подтверждение в работах других авторов [8, 35–37].

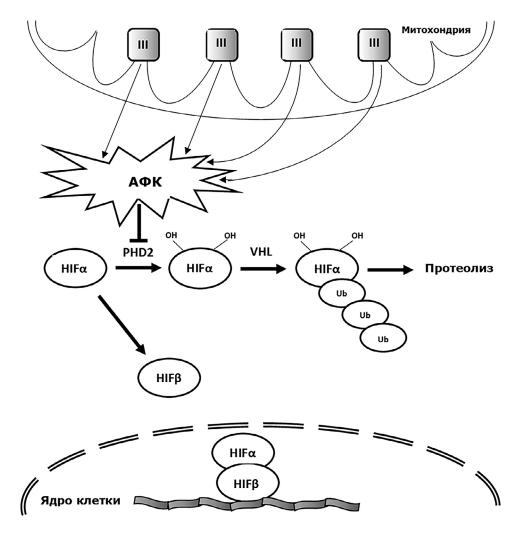


Рис. 1. Ингибирование в цитозоле метаболизма субъединицы HIF-α активными формами кислорода митохондриального генеза, возникающими под влиянием гипоксии: III — митохондриальный комплекс III; AФК — активные формы кислорода; PHD — пролилгидроксилаза; VHL — фактор фон Хиппел—Линдау; HIF — фактор, индуцированный гипоксией; Ub — убиквитин

Недавно были получены доказательства того, что основным источником АФК, оказывающим решающее влияние на кислородный гомеостазис клетки, является комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования [4, 38, 39]. Последовательность событий по вовлечению митохондриальных АФК в организацию клеточного ответа на гипоксию представлена на рис. 1. Под влиянием гипоксии комплексы III дыхательных цепей митохондрий выделяют часть супероксид-анион радикалов в межмембранное пространство [10, 40]. В этом митохондриальном компартменте при участии супероксиддисмутазы названный радикал превращается в  $H_2O_2$  [41, 42]. Далее молекулы перекиси водорода выходят в цитозоль, где оказывают модулирующее влияние на активность фермента пролилгидроксилаза 2 [4, 9, 10].

Семейству ферментов пролилгидроксилаз (PHD) требуется молекулярный кислород как субстрат для деградации фактора, индуцированного гипоксией (HIF), в частности его изоформы HIF-α. Это происходит перманентно в нормоксических условиях. Под влиянием гипоксии, т.е. при уменьшении концентрации молекул кислорода в цитозольном окружении PHD2 активность этого фермента снижается, и деградация HIF прекращается. В этом случае молекулы индуцированного гипоксией фактора перемещаются в ядро клетки, испытывающей недостаток кислорода, запускается транскрипция семейства «гипоксических» генов и формируется клеточный гипоксический ответ [43].

Каким же образом увеличение концентрации AФК в цитозоле при гипоксии может приводить к ингибированию активности PHD2 и

52 ВЁТОШ

стабилизации HIF? По мнению Waypa et al. [6] и их единомышленников [44, 45], AФК успевают частично денатурировать молекулы ферментов, что ведет к уменьшению их активности.

Митохондрии эукариотических клеток до недавнего времени оставались наиболее вероятными кандидатами на роль места для кислородных сенсоров [4, 6, 10]. На сегодняшний день собрано достаточное количество доказательств того, что побочные продукты биоэнергетической активности митохондрий – АФК – могут принимать модулирующее участие в цитозольных процессах формирования клеточного ответа на гипоксию [6, 8, 39]. Прооксиданты предстают в этом случае не в качестве О2-сенсоров, а скорее в роли О<sub>2</sub>-маркеров. В современных терминах АФК митохондриального генеза являются участниками сигнальных путей, обеспечивающих сохранение кислородного гомеостаза клетки в условиях недостатка кислорода [4, 10]. Можно ожидать, что у этой сигнальной сети более чем один вход.

#### КИСЛОРОД-ЧУСТВИТЕЛЬНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Плазматическая мембрана клетки является первым барьером на пути молекулярного кислорода к сайтам его внутриклеточного использования. По мнению Бенджамина Льюина [46], очень маленькие нейтральные молекулы кислорода легко преодолевают бислойную липидную основу клеточных мембран. Общим свойством всех живых клеток является наличие регулируемого ионного градиента на плазматических мембранах. Отражением динамики этого лабильного процесса является мембранный потенциал, который создается многочисленными классами встроенных в билипидный слой ионных каналов. При формировании мембранного потенциала в клетках животных главным образом участвуют ионы K+, Na+ и Cl-. Переносящие их каналы испытывают влияние многих факторов (напряженность электрического поля, концентрация ионов Са<sup>2+</sup>, Н<sup>+</sup>, молекул АТР и т.д.) [47].

После 1988 года в перечень влияний, модулирующих активность мембранных ионных каналов, переносящих  $K^+$ , попал молекулярный кислород. Информация, опубликованная Lopez-Barneo et al. [1], была неожиданной и в последующие годы тщательно проверялась. Уже спустя 9 лет появился первый обзор о влиянии недостатка кислорода на кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости ( $BK_{Ca}$ ), который насчитывал 73 публикации по данной теме [48].

Авторы обзора констатировали, что выключение ВК<sub>Са</sub> при уменьшении парциального давления кислорода в инкубационном растворе до значений >20 торр не вызывает сомнений. Это оказалось справедливо для широкого класса цитоморфных моделей (гладкомышечных клеток артериальных сосудов, нейронов коры, гиппокампа и черной субстанции, клеток 1-го типа каротидных тел, клеток нейроэпителиальных тел в бифуркациях бронхов). Важно отметить, что  $BK_{Ca}$  реагировали на гипоксию как в составе неповрежденной клеточной мембраны целых клеток, так и при регистрации в режиме patch clamp. В обзоре было высказано предположение о том, что и другие типы ионных каналов, возможно, испытывают модулирующее влияние со стороны молекул кислорода.

На втором этапе исследований кислородной чувствительности  $K^+$  каналов специалисты заинтересовались конструкцией этих молекулярных агрегатов. Искали домены, непосредственно отвечающие за сенсорную трансдукцию концентрации молекул кислорода в околоканальном пространстве в процессе исполнительного акта закрытия селективных переносчиков ионов  $K^+$  [49]. Группа кислород-чувствительных калиевых каналов, исследованных авторами, включала три семейства, содержащие более 14 видов [50, 51]. Однако ни в  $\alpha$ -, ни в  $\beta$ -субъединицах различных типов калиевых каналов такие кислород-чувствительные домены найдены не были [49, 51].

На третьем этапе появились зачатки так называемой «мембранной гипотезы» [47, 49, 52]. Эта гипотеза формировалась, как попытка ответить на сформулированные к началу XXI века вопросы. Почему только калиевые каналы чувствительны к изменениям концентрации  $O_2$ ? Как они могут длительное время работать без митохондриальной поддержки при регистрации в режиме раtch clamp? Являются ли  $BK_{Ca}$  каналы кислородными сенсорами или только эффекторным звеном в реакции на гипоксию? Почему реакция калиевых каналов на уменьшение концентрации кислорода происходит очень быстро?

Различные группы исследователей предположили существование неизвестных белковых ансамблей, прямо или дистантно связанных с кислород-чувствительными калиевыми ионными каналами [47, 49]. Кандидатами в члены этих ансамблей называли глутатион, активированную протеинкиназу, гемоксигеназу-2, NADP(H)-оксидазу и другие белки [47, 53, 54].

Было показано, что  $BK_{Ca}$  тесно связаны с гемоксигеназой-2. В экспериментах, проводимых на клетках I-го типа каротидных тел крыс, ис-

пользуя масс-спектрометрический анализ и коиммунопреципитацию, установили тесную ассоциацию молекулярной конструкции кальций-зависимых калиевых каналов высокой проводимости с НО-2 [55]. Катаболизируя геминовые молекулы, гемоксигеназа-2 продуцирует монооксид углерода, биливердин и Fe<sup>2+</sup>. При нормоксии в качестве кофакторов участвуют NADP(H) и молекулярный кислород. Показано, что монооксид углерода при этом выступает как активатор  $BK_{Ca}$ каналов [56]. При гипоксии, когда кислородный кофактор становится дефицитным, тоническое укрепляющее влияние монооксида углерода на ВК<sub>Са</sub> ослабевает, и их проводимость для ионов калия снижается. Молекулы гемоксигеназы-2 выступают, таким образом, в качестве кислородного сенсора при кальций-зависимых калиевых каналах высокой проводимости. Другие группы авторов сумели показать ингибирующее участие  $H_2S$  в управлении  $BK_{C_3}$  на фоне гипоксии в клетках І-го типа каротидных тел мышей, крыс и человека [57, 58]. Это заставило включить в объяснительную модель кислородной чувствительности калиевых каналов два внутриклеточных газотрансмиттера: CO и  $H_2S$  [52].

Позднее мембранная гипотеза приобрела черты необходимого оформления, если не завершения [51, 59]. Ионные каналы плазматических мембран играют значительную роль в процессах сенсорной трансдукции различной модальности: либо как первичные сенсорные элементы, либо как последующие звенья эффекторной сети [60]. Калиевые каналы клеток I-го типа каротидных тел позвоночных являются примером каналов с эффекторной специализацией. Среди них семейства Kv3, Kv4, BK<sub>Ca</sub> и TASK [50, 52]. Доказано, что проводимость калиевых каналов этих типов зависит от концентрации молекулярного кислорода на поверхности плазматических мембран содержащих их клеток [1, 51]. Открытым оставался вопрос: «Какая часть молекулярного конструкта ионного канала или ассоциированных с функционированием канала сателлитных молекул является кислородным сенсором?».

Авторы мембранной гипотезы Chris Peers и Nanduri Prabhakar считают, что калиевые каналы являются эффекторной частью сигнальной сети в чувствительных к кислороду цитосистемах [49, 51, 52]. Восприимчивыми же к недостатку кислорода следует считать процессы функционирования ассоциированных с калиевыми каналами макромолекул [47, 53, 54]. Среди них HO-2, NADP(H), цистатионин-гаммалиаза (CSE), гуанилатциклаза (GC), циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) и протеинкиназа G (PKG).

Взаимодействие мембранных калиевых каналов различных семейств с ассоциированными белками представлено на рис. 2. Гемоксигеназа-2 осуществляет деградацию гема, превращая его в биливердин, ион двухвалентного железа и монооксид углерода. Кофакторами деградации гема при нормоксии выступают NADP(H) и молекулярный кислород [61]. Вышеназванные процессы происходят в том числе и в гломусных клетках каротидных тел [56, 62].

Молекулы СО оказывают активирующее действие на кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости [57, 63, 64]. Гипоксия уменьшает продукцию молекул монооксида углерода в каротидных телах. Такое же действие производит блокатор HO-2 цинкпротопорфирин-9 [62]. Эти СО-дефицитные состояния ведут к закрытию  $BK_{Ca}$  [51].

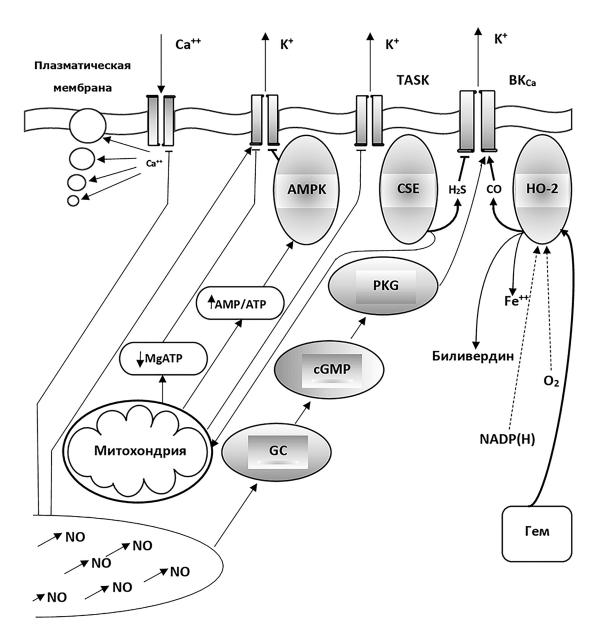
Таким образом, уменьшение концентрации молекулярного кислорода в цитоплазматическом окружении конститутивной HO-2, ассоциированной с  $BK_{Ca}$ , понижает ее каталитическую активность. Это приводит к ограничению синтеза внутриклеточного газотрансмиттера — монооксида углерода, который является активатором  $BK_{Ca}$ . Дефицит CO в ходе развития гипоксического состояния клетки ведет к закрытию калиевых каналов.

Это нарушает динамику формирования мембранного потенциала гломусных клеток каротидных тел и некоторых других кислородчувствительных клеточных конструктов.

Следовательно, гемоксигеназа-2 клеток I-го типа каротидных тел позвоночных является тем молекулярным внутриклеточным объектом, в котором происходит сенсорная трансдукция концентрации внутриклеточного кислорода в управляющий сигнал для эффекторов — ВК<sub>са</sub>. Свою версию мембранной гипотезы авторы считают доказанной [51]. Ее эвристическая сила нашла подтверждение в исследовании на системном уровне. У молодых здоровых испытуемых была отмечена редукция вентиляторного ответа на гипоксию после кратковременной ингаляции избытка монооксида углерода [65].

В дополнение к СО-зависимому механизму модуляции активности калиевых каналов гломусных клеток каротидных тел существует вторая интрацеллюлярная сигнальная цепь. Центральным звеном этой цепи является цистатионин-гамма-лиаза [66, 67]. Данный фермент синтезирует внутриклеточный газотрансмиттер  $H_2S$ , который экспрессируется в гломусных клетках каротидных тел позвоночных [51, 57, 68]. В условиях нормоксии синтез молекул сероводорода минимален, но при гипоксии генерация  $H_2S$  увеличивается пропорционально на-

54 ВЁТОШ



**Рис. 2.** Взаимодействие мембранных калиевых каналов различных семейств с ассоциированными белками: **Q**— ассоциированные с каналами белки;  $\rightarrow$  — активирующее действие;  $\rightarrow$  — блокирующее действие;  $\bigcirc$  — везикулы с медиатором, продуцируемым гломусными клетками каротидных тел; AMPK — AMФ-активируемая протеинкиназа; CSE — цистатионингамма-лиаза; HO-2 — гемоксигеназа-2; PKG — протеинкиназа g; MgATP — активируемая магнием ATPаза; сGMP — циклический гуанилатмонофосфат; GC — гуанилат-циклаза

растанию дефицита кислорода [57, 69]. У нокаутированных по CSE мышей отсутствует увеличение синтеза  $H_2S$  в ответ на гипоксию. Блокатор CSE — пропаргил-L-глицин также нивелирует продукцию внутриклеточного сероводорода [59]. Сегодня принято считать, что CSE является главным продуцентом внутриклеточного  $H_2S$  в ответ на гипоксию [51]. Искусственное увеличение количества молекул сероводорода в клетках каротидных тел активирует этот орган пропорционально степени воздействия [57, 70].

Совокупность накопленных экспериментальных данных позволяет считать продукт деятельности цистатионин-гамма-лиазы ( $H_2S$ ) обязательным участником процесса формирования клеточного ответа каротидных тел на гипоксический стимул.

В 2010 году Li et al. [58] первыми выявили влияние избытка внутриклеточного сероводорода на ионные каналы гломусных клеток каротидных тел. Позднее было уточнено, что мишенью для  $H_2S$  являются  $BK_{Ca}$ , но влияние сероводоро-

да на них отличается от влияния монооксида углерода [59]. Внутриклеточный сероводород провоцирует вход в гломусные клетки ионов кальция [70]. Этот же газотрансмиттер оказывает ингибирующее влияние на калиевые каналы семейства ТАЅК через угнетение процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях гломусных клеток [70, 71]. Однако главной мишенью для продукта каталитической деятельности СЅЕ — сероводорода — в клетках І-го типа каротидных тел являются каналы ВК<sub>Са</sub> [59, 72].

Таким образом, в условиях нормоксии фермент CSE малоактивен. На фоне нарастающей внутриклеточной гипоксии его активность растет пропорционально дефициту кислорода, что сопровождается повышением интенсивности генерации H<sub>2</sub>S. Этот газотрансмиттер ингибирует активность ВКса и косвенно через митохондрии уменьшает проводимость калиевых каналов иных семейств, в частности TASK. Следовательно, цистатионин-гамма-лиаза клеток І-го типа каротидных тел позвоночных является еще одним молекулярным внутриклеточным объектом, в котором происходит сенсорная трансдукция концентрации интрацеллюлярного кислорода в управляющий сигнал для эффекторов —  $BK_{Ca}$ . Можно констатировать, что в клетках I-го типа каротидных тел позвоночных имеется более чем один механизм сенсорной трансдукции интрацеллюлярной концентрации молекулярного кислорода в изменении активности калиевых каналов. СО и Н<sub>2</sub>S газотрансмиттеры действуют на эффекторную часть кислородчувствительной сигнальной цепи по ходу нарастания гипоксического стимула противоположным образом. При этом концентрация молекул СО уменьшается, и ВКса лишаются поддерживающего влияния, а концентрация H<sub>2</sub>S растет, что стимулирует закрытие калиевых каналов. Клетка при гипоксии оказывается под надежным двойным контролем.

По мнению авторов последней версии «мембранной гипотезы», третий внутриклеточный газотрансмиттер – NO – также участвует в регулировании внутриклеточного кислородного гомеостазиса. Давно известно, что гипоксия уменьшает активность NO-синтазы (NOS), в том числе ее нейрональной изоформы nNOS в гломусных клетках каротидных тел [73]. Последняя не экспрессируется в клетках І-го типа и, по замыслу авторов, попадает в них из окружающих эти клетки эфферентных отростков глоссофаренгиального нерва [51, 73, 74]. Есть данные о том, что искусственное увеличение количества молекул NO в клетках каротидных тел активирует ВК<sub>Са</sub> [75]. Однако эти результаты не были подтверждены в иных экспериментальных условиях [76]. Установлено, что стимулирующее влияние NO на  $BK_{Ca}$  передается от монооксидов азота, проникающих в гломусные клетки через гуанилатциклазу, циклический гуанозинмонофосфат и далее через протеинкиназу g [77, 78].

Давно известно, что самый оперативный (быстрый) клеточный ответ на острую гипоксию свойственен гломусным клеткам каротидных тел. Сегодня не вызывает сомнения тот факт, что в этом ответе участвуют мембранные калиевые каналы нескольких семейств.  $BK_{Ca}$  фигурирует сразу в нескольких сигнальных цепях гипоксического клеточного метаболизма в качестве эффекторного звена. Кислородным сенсором при  $BK_{Ca}$  является гемоксигеназа-2. Наряду с этим хорошо известны молекулярные механизмы цитоплазматического ответа на хроническое гипоксическое воздействие.

#### ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КИСЛОРОДУ

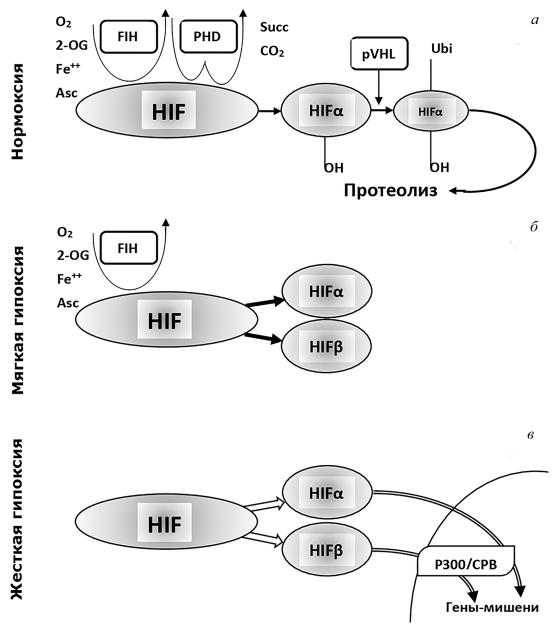
Каротидные тела являются примером системного «сенсора на кислород» [79, 80]. В свою очередь, гемоксигеназа-2 имеет статус ассоциированного с плазматической мембраной «кислородного сенсора» для гломусных клеток І-го типа каротидных тел [51]. Наряду с этим в цитоплазме всех клеток Метагоа имеется сигнальный пул, центральным звеном которого является НІГ — фактор, индуцированный гипоксией [81]. В этом пуле следует искать еще один клеточный сенсор на кислород.

История открытия и исследования НІГ-пула кратко изложена в работе Szewczak [82]. Многолетнее изучение регуляторной роли эритропоэтина (Еро) привело к открытию кодирующего его гена [83], а вслед за этим активируемого гипоксией фактора НІГ цитоплазматической локализации, запускающего транскрипцию этого гена [2]. Последующий анализ показал, что НІГ запускает массивный транскрипционный каскад генов в клетках млекопитающих в ответ на уменьшение доставки кислорода [3, 84].

Состав, структура и функционирование HIFs обсуждаются в многочисленных обзорах [85–87]. Схематически эти данные представлены на рис. 3.

При нормоксии напряжение кислорода в цитоплазме клетки находится в пределах 20—7 торр (рис. 3, *a*). В таких условиях резидентно присутствующие в клетках молекулы HIF подвергаются протеосомальной деградации. На первом этапе катаболизма HIF на него, в свою очередь, действует молекулярный фактор FIH (фактор ингибирования HIF). Он отщепляет от

56 ВЁТОШ



**Рис. 3.** Схема цитоплазматического кислород-чувствительного пула метаболитов с участием HIF: нормоксия (a), мягкая гипоксия (b) и жесткая гипоксия (b); 2-OG — 2-оксиглутарат; Asc — аскорбиновая кислота; FIH — фактор, ингибирующий HIF; PHD — домен пролилгидроксилазы; Succ — янтарная кислота; pVHL — белок супрессии опухоли фон Хиппел—Линдау; Ubi — убиквитин; P300/CBP — коактиватор транскрипции

HIF аспарагиновый фрагмент. Реакция идет в присутствии достаточного количества кислорода, 2-оксоглутарата, ионов двухвалентного железа и аскорбиновой кислоты [87].

Наряду с этим на начальном этапе протеолиза молекул HIF вступает в действие пролилгидроксилаза, которая присоединяет к двум молекулам пролина в α-субъединице ОН-группы. В результате образуется диоксид углерода и янтарная кислота [88]. На следующем этапе деградации HIF-α под влиянием белка супрессии опу-

холи фон Хиппел—Линдау и при участи убиквитина попадает в протеасомы, где подвергается окончательной фрагментации [80, 84].

На исходном этапе развития внутриклеточной мягкой гипоксии при умеренном снижении напряжения кислорода в цитоплазме катаболизм HIF изменяется (рис. 3,  $\delta$ ). Выпадает звено с участием пролилгидроксилазы. Полученные промежуточные продукты HIF- $\alpha$  и HIF- $\beta$  не доходят до протеасом, и окончательный цикл протеолиза не получает завершения [84, 87].

Метаболизм с участием HIF на фоне тяжелой гипоксии представлен на рис. 3,  $\epsilon$ . В условиях недостатка кислорода начальные этапы протеолиза с участием FIH и PHD становятся невозможными. Более жесткая гипоксия ингибирует гидроксилирование аспарагинового фрагмента HIF. HIF- $\alpha$  и HIF- $\beta$  в этом случае способны совместно с коактиватором транскрипции P300/CBP включать процессы транскрипции генов-мишеней, чья компетенция относится к участию в преодолении кислородного дефицита [80, 84, 85].

По последним оценкам массивный транскрипционный каскад, инициируемый НІГ, может затрагивать до 1500 генов [84, 89, 90]. Скорость реагирования клеток на гипоксию с вовлечением метаболического НІГ-пула не высока. Самые ранние результаты активирования генома в ответ на внутриклеточный недостаток кислорода проявляются через час [91]. Пик экспрессии генов в условиях хронической внутриклеточной гипоксии наступает через 24 ч [80]. Нокаутированные по НІГ мыши погибают на 10-й день эмбрионального развития, что свидетельствует о востребованности этого механизма регулирования кислородного гомеостаза клеток уже на пренатальном этапе [92].

Анализ изменений метаболизма клеток Метагоа в ответ на уменьшение концентрации кислорода показывает наличие кластера из двух сотен кислород-чувствительных белков, запускающих каскады посттрансляционной модификации других белков. Гидроксилазы — один из важнейших элементов этого кластера. Среди них выделяют пролилгидроксилазы, которые гидроксилируют пролин в белковых молекулах [81, 93].

Домен PHD, ассоциированный с трансляцией молекул HIF в цитоплазме клеток, в условиях клеточной нормоксии постоянно гидроксилирует пролин α-субъединицы этой гетеродимерной молекулы. Гидроксилирование осуществляется сначала в позиции P564, а затем в P402, что приводит к кислород-зависимой деградации HIF-1α [91, 94]. Таким образом, PHD является ближайшим (проксимальным) регулятором активности HIF [9]. Это заставляет нас считать цитоплазматическим сенсором на кислород не HIF, а HIF-гидроксилазы, в том числе PHD [93, 95].

Центральным звеном сигнального пула с участием HIF является семейство индуцированных гипоксией транскрипционных факторов (HIF $_{\rm s}$ ). Этот фактор представляет собой гетеродимерный молекулярный конструкт, состоящий из кислород-чувствительных субъединиц HIF- $\alpha$  и конститутивных субъединиц HIF- $\beta$  [4, 96]. У высших многоклеточных встречаются три вариации HIF- $\alpha$  субъединиц: HIF- $1\alpha$ , HIF- $2\alpha$  и HIF- $3\alpha$ . Первый экспрессируется во многих, если не всех

клетках млекопитающих, а HIF-2 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  присутствуют в некоторых видах эндотелия и соединительной ткани [80, 85, 97]. Кроме кислорода на метаболиты HIF-пула действуют АФК, оксид азота, HSP90 и другие молекулы, обладающие сигнальным потенциалом [6, 10]. Рассмотрим детали этих регуляторных процессов.

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМОВ КИСЛОРОДНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

Митохондриальные, мембранные и цитоплазматические механизмы обеспечения кислородного гомеостаза клетки, являясь активными участниками целлюлярного метаболизма, не могут быть свободными от взаимного влияния друг на друга [49, 54]. К 2008 году Ward [54] различал три возможных механизма влияния кислород-чувствительных процессов в митохондриях на пластический и энергетический клеточный метаболизм. За прошедшие годы сложилось мнение, что основное влияние митохондрий на цитоплазматические и мембранные механизмы кислородной чувствительности клетки осуществляется главным образом через активные формы кислорода [4, 6, 8, 39].

Метаболический пул цитоплазматических процессов, в которых мастером-регулятором является HIF, представлен на рис. 1 и 3. Активные формы кислорода (Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>) выходят из митохондрий (комплекс III), диффундируют в цитозоле и оказывают супрессирующее влияние на активность фермента пролилгидроксилаза 2 [41, 42]. На фоне развивающейся гипоксии этот процесс усиливается. Как следствие, прекращается деградация HIF. В этом случае разновидности молекул индуцированного гипоксией фактора перемещаются в ядро клетки, испытывающей недостаток кислорода. Запускается транскрипция семейства «гипоксических» генов и формируется клеточный гипоксический ответ [43]. Такого рода механизм не может быть быстрым. Следовательно, реакция на гипоксию при участии HIF-пула оказывается эффективной в случае хронического недостатка кислорода.

Наряду с этим имеет место влияние HIF-пула на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях [80, 98]. Транскрипция гена, кодирующего киназу пируватдегидрогеназы, запускается под влиянием HIF. Эта киназа фосфорилирует субъединицу пируватдегидрогеназы E1α, тем самым инактивируя этот ферментный комплекс, который конвертирует пируват в ацетил-коэнзим А. Под влиянием HIF это происходит как за счет депривации по глюкозе, так

58 ВЁТОШ

и путем ограничения использования жирных кислот. В последнем случае HIF-1 индуцирует транскрипцию микроРНК miR210, которая, в свою очередь, уменьшает экспрессию железосеросодержащих каркасных белков ISCU1/2. Как следствие, происходит ингибирование активности цикла трикарбоновых кислот, снижение интенсивности окислительного фосфорилирования и редукция потребления кислорода митохондриями [99, 100]. Таким образом, HIF на фоне развития гипоксии в соответствии с принципом обратной связи оказывает влияние на источник внутриклеточных АФК.

Антиоксидантный потенциал клеток также находится под влиянием HIF-пула. В условиях гипоксии HIF-1 и HIF-2 активируют транскрипцию соответствующих генов, что ведет к запуску в митохондриях процессов дополнительного синтеза глутатиона — базового компонента антиоксидантной системы [101].

Следовательно, НІГ-пул и митохондриальный метаболизм клетки сопряжены системой обратных связей, обеспечивающих сохранение в определенных пределах ее кислородного гомеостазиса. На сегодняшний день известны два контура обратной связи (прооксидантный и антиоксидантный) между митохондриальными и НІГ-пулами клетки, которые балансируют их взаимное влияние. Схематически это представлено на рис. 4.

Взаимодействия митохондриального метаболического пула и мембранно-агрегированных механизмов кислородного гомеостаза клетки исследованы в меньшей степени [4, 52, 102]. В условиях быстро развивающейся гипоксии комплекс І в цепи ферментов окислительного фосфорилирования увеличивает продукцию  $A\Phi K$  (O<sub>2</sub>·<sup>−</sup>) [4, 103]. Активные формы кислорода, в свою очередь, ингибируют проводимость кальциевых каналов, расположенных на плазматической мембране клетки [4]. Повышение концентрации АФК вблизи внутренней поверхности плазматической мембраны блокирует проводимость ионов калия через TASK каналы [54]. Эта же причина ведет к закрытию кальцийзависимых калиевых каналов высокой проводимости [6]. Таким образом, можно считать доказанным, что АФК в условиях быстро развивающейся гипоксии оказывают тормозное влияние на проводимость кальциевых и калиевых каналов, расположенных поблизости от ассоциированных с этими каналами митохондрий [102, 103]. Следовательно, побочные прооксидантные продукты метаболизма митохондрий на фоне гипоксии способствуют деполяризации клетки за счет ингибирования нескольких семейств калиевых каналов (рис. 4).

Детальные изменения в мембранно-связанных микродоменах, объединяющих каналы и митохондрии, интенсивно исследуются в настоящее время. Не меньший интерес специалистов вызывают взаимодействия чувствительных к недостатку кислорода мембранных механизмов и HIF-пула цитоплазмы клетки.

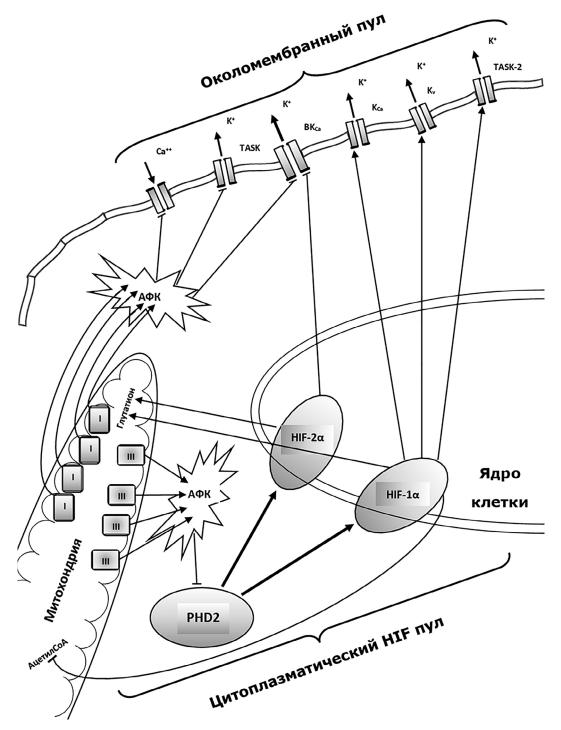
Количество экспериментальных исследований взаимного обмена сигналами между кислород-чувствительными каналами плазматической мембраны клетки и HIF-пулом невелико. Нам не удалось найти ни одного обзора на эту тему. В 2006 году Tajima et al. [104] привели доказательства влияния HIF-пула клеток культуры меланомы человека в ходе длительной гипоксии на увеличение проводимости кальций-зависимых калиевых каналов (К<sub>Са</sub>). Это происходило под действием избыточной экспрессии HIF-1a в ответ на недостаток кислорода в среде культивирования. Позднее аналогичный эффект был получен на культурах гладкомышечных клеток легочной артерии крыс для семейства потенциал-зависимых калиевых каналов (К<sub>v</sub>) [105] и WEHI-231B клеток мыши для TASK-2 калиевых каналов [106].

Имеются отдельные сведения о том, что в условиях продолжительной гипоксии молекулы HIF-2 $\alpha$  осуществляют репрессию генов, ответственных за синтез  $\beta_1$  субъединицы BK<sub>Ca</sub> [107].

В последние годы появились данные о прямом влиянии пролилгидроксилаз из HIF-пула на катионные каналы семейства TRP (TRPA1 и TRPV3). В условиях нормоксии пролилгидроксилазы не только направляют HIF на путь протеосомальной деградации, но и ингибируют активность TRPA1. При снижении напряжения кислорода в цитоплазме это ингибирование ослабевает, и в условиях гипоксии происходит его отмена [108, 109].

Полученные данные свидетельствуют о противоположных тенденциях (активирующих и тормозящих) влияния НІГ-пула клетки на мембранно-связанные механизмы регулирования клеточного кислородного гомеостаза. Для прояснения приоритетов данного механизма регуляции требуются дальнейшие исследования [110].

Данных об ответном влиянии кислородчувствительных калиевых каналов плазматической мембраны клеток на HIF-пул найти не удалось. Отсутствие таких данных можно объяснить колоссальной разницей в скорости реагирования ионных каналов (несколько секунд) и метаболизма HIF-пула (десятки минут) на гипоксический стимул. В этом случае медленные процессы могут оказывать эффективное влияние на быстрые, но не наоборот.



**Рис. 4.** Сигнальные отношения между метаболическим пулом митохондрий, цитоплазматическим HIF-пулом и околомембранными механизмами кислородной чувствительности клетки:  $A\Phi K$  — активные формы кислорода; I — комплекс I в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; PHD2 — домен пролилгидроксилазы III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III — комплекс III в цепи ферментов III в цепи ферментов окислительного ферментов III в цепи ферментов III в це

Таким образом, оба основных механизма регулирования кислородного гомеостазиса клетки (цитоплазматический и мембранный) в купе с модулирующим влиянием митохондриального метаболизма на фоне действия гипоксических

стимулов различной модальности тесно взаимосвязаны и дополняют друг друга.

Приведенные в обзоре данные позволяют сделать вывод, что клетки Metazoa обладают несколькими способами определения содержа-

ния кислорода в клеточном объеме. На фоне быстроразвивающейся гипоксии детекцию недостатка кислорода осуществляет околомембранный пул калиевых каналов с ассоциированными белками. В условиях хронической гипоксии клеточным ответом на уменьшение концентрации кислорода управляет метаболический пул, мастером-регулятором в котором является HIF. Влияние митохондриального метаболизма на эти два полюса кислородно-сенсорной активности ограничиваются модуляцией через АФК. Следует особо отметить, что вышеперечисленные внутриклеточные механизмы вполне успешно реализуют реакции клеток на недостаток кислорода. Избыточные по отношению к норме концентрации окислителя, очевидно, могут также встречаться внутри клеток при экспонировании организма в условиях гипероксии, но их влияние реализуется пока еще недостаточно изученными способами [111–113].

**Благодарности.** Автор выражает благодарность Л.Б. Буравковой за полезные и конструктивные обсуждения в ходе выполнения работы.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988) Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells, *Science*, 241, 580–582.
- 2. Semenza, G., and Wang, G. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447–5454.
- 3. Semenza, G., Roth, P., Fang, H., and Wang, G. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23757–23763.
- 4. McElroy, G., and Chandel, N. (2017) Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia, *Exp. Cell Res.*, **356**, 217–222, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.034.
- 5. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. (2010) Мембранная биоэнергетика, Изд-во МГУ, Москва.
- Waypa, G., Smith, K., and Schumacher, P. (2016) O<sub>2</sub> sensing, mitochondria and ROS signaling: the fog is lifting, *Mol. Aspects Med.*, 47–48, 76–89, doi: 10.1016/j.mam.2016.01.002.
- 7. Santore, M., McClintock, D., Lee, V., Budinger, G., and Chandel, N. (2002) Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **282**, L727–L734, doi: 10.1152/ajplung.00281.2001.
- 8. Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., and Sgarbi, G. (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1797**, 1171–1177, doi: 10.1016/j.bbabio.2010.02.011.
- 9. Bell, E., and Chandel, N. (2007) Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species, *Essays Biochem.*, **43**, 17–27, doi: 10.1042/BSE0430017.
- Hamanaka, R., and Chandel, N. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 21, 894–899, doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.005.
- 11. Atkinson, D. (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry*, 7, 4030–4034.
- Koo, Y., Cao, Y., Kopelman, R., Koo, S., Brasuel, M., and Philbert, M. (2004) Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors, *Anal. Chem.*, 76, 2498–2505, doi: 10.1021/ac035493f.
- 13. Mik, E., Stap, J., Sinaasappel, M., Beek, J., Aten, J., van Leeuwen, T., and Ince, C. (2006) Mitochondrial PO<sub>2</sub> mea-

- sured by delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX, *Nat. Methods*, **3**, 939–945, doi: 10.1038/nmeth940.
- 14. Быстрова М.Ф., Буданова Е.Н. (2007) Перекись водорода и пероксиредоксины в редокс-регуляции внутриклеточной сигнализации, *Биологические мембраны*, **24**, 115–125.
- Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. (2007) Редокс-регуляция клеточных функций, *Биохимия*, 72, 158–174.
- Hopkins, B.L., and Neumann, C.A. (2019) Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response, *Redox Biol.*, 21, 101–104, doi: 10.1016/j.redox.2019.101104.
- Quinlan, C., Perevoshchikova, I., Hey-Mogensen, M., Orr, A., and Brand, M. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates, *Redox. Biol.*, 23, 304–312, doi: 10.1016/j.redox.2013.04.005.
- Goncalves, R., Bunik, V., and Brand, M. (2016) Production of superoxide/hydrogen peroxide by the mitochondrial 2-oxoadipate dehydrogenase complex, *Free Radic. Biol. Med.*, 91, 247–255, doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2015.12.020.
- Sena, L., and Chandel, N. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species, *Mol. Cell*, 48, 158–167, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
- McCord, J. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, New Engl. J. Med., 312, 159–163, doi: 10.1056/NEJM198501173120305.
- 21. Cross, C., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames, B., Saul, R., McCord, J., and Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526–545.
- 22. Archer, S., Peterson, D., Nelson, D., DeMaster, E., Kelly, B., Eaton, J., and Weir, E. (1989) Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung, *J. Appl. Physiol.*, **66**, 102–111, doi: 10.1152/jappl.1989.66.1.102.
- 23. Michelakis, E., Archer, S., and Weir, E. (1995) Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: a model of oxygen sensing, *Physiol. Res.*, **44**, 361–367.
- Chandel, N., McClintock, D., Feliciano, C., Wood, T., Melendez, J., Rodriguez, A., and Schumacker, P. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-lalpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing, *J. Biol. Chem.*, 275, 25130–25138, doi: 10.1074/jbc.M001914200.
   Waypa, G., Marks, J., Mack, M., Boriboun, C., Mungai, P.,
- Waypa, G., Marks, J., Mack, M., Boriboun, C., Mungai, P., and Schumacker, P. (2000) Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes, *Circ. Res.*, 91, 719–726.

- Guzy, R., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K., Simon, M., Hammerling, U., and Schumacker, P. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, *Cell Metab.*, 1, 401–408, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.001.
- Mansfield, K., Guzy, R., Pan, Y., Young, R., Cash, T., Schumacker, P., and Simon, M. (2005) Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation, *Cell Metab.*, 1, 393–399, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.003.
- Lebuffe, G., Schumacker, P., Shao, Z., Anderson, T., Iwase, H., and Vanden Hoek, T.L. (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284, H299–H308, doi: 10.1152/ajpheart.00706.2002.
- Guzy, R., Mack, M., and Schumacker, P. (2007) Mitochondrial complex III is required for hypoxiainduced ROS production and gene transcription in yeast, *Antioxid. Redox Signal.*, 9, 1317–1328, doi: 10.1089/ ars.2007.1708.
- 30. Boveris, A., and Cadenas, E. (2000) Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone, *IUBMB Life*, **50**, 245–250, doi: 10.1080/713803732.
- Sabharwal, S., and Schumacker, P. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer*, 14, 709–721, doi: 10.1038/nrc3803.
- Waypa, G., Marks, J., Guzy, R., Mungai, P., Schriewer, J., Dokic, D., and Schumacher P. (2010) Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, 106, 526–535, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206334.
- 33. Brand, M. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14–31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
- 34. Remington, S. (2006) Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 714–721, doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.001.
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I., and Finkel, T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation, *Circ. Res.*, 97, 967–974, doi: 10.1161/01.RES.0000188210.72062.10.
   Pan, Y., Mansfield, K., Bertozzi, C., Rudenko, V., Chan, D.,
- Pan, Y., Mansfield, K., Bertozzi, C., Rudenko, V., Chan, D., Giaccia, A., and Simon, M. (2007) Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity *in vivo* and *in vitro*, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 912–925, doi: 10.1128/ MCB.01223-06.
- Finkel, T. (2012) Signal transduction by mitochondrial oxidants, *J. Biol. Chem.*, 287, 4434–4440, doi: 10.1074/jbc.R111.271999.
- Bell, E., and Chandel, N. (2007) Genetics of mitochondrial electron transport chain in regulating oxygen sensing, *Methods Enzymol.*, 435, 447–461, doi: 10.1016/S0076-6879(07)35023-4.
- Orr, A., Vargas, L., Turk, C., Baaten, J., Matzen, J., Dardov, V., Attle, S., Li, J., Quackenbush, D., Goncalves, R., Perevoshchikova, I., Petrassi, H., Meeusen, S., Ainscow, E., and Brand, M. (2015) Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III, *Nat. Chem. Biol.*, 11, 834–836, doi: 10.1038/nchembio.1910.
- Sabharwal, S., Waypa, G., Marks, J., and Schumacker, P. (2013) Peroxiredoxin-5 targeted to the mitochondrial intermembrane space attenuates hypoxia-induced reactive oxygen species signaling, *Biochem. J.*, 456, 337–346, doi: 10.1042/BJ20130740.
- Murphy, M. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, 417, 1–13, doi: 10.1042/BJ20081386.

- Murphy, M., Holmgren, A., Larsson, N., Halliwell, B., Chang, C., Kalyanaraman, B., Rhee, S., Thornalley, P., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P., and Winterbourn, C. (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species, *Cell Metab.*, 13, 361–366, doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.010.
- 43. Semenza, G. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell*, **148**, 399–408, doi: 10.1016/j.cell. 2012.01.021.
- 44. Rhee, S., Woo, H., Kil, I., and Bae, S. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4403–4410, doi: 10.1074/jbc.R111.283432.
- Chowdhury, R., Flashman, E., Mecinović, J., Kramer, H., Kessler, B., Frapart, Y., Boucher, J., Clifton, I., McDonough, M., and Schofield, C. (2011) Studies on the reaction of nitric oxide with the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 (EGLN1), *J. Mol. Biol.*, 410, 268–279, doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.075.
- 46. Льюин Б. (2016) В кн. *Клетки по Льюину* (под ред. Кассимерис Л., Лингаппа В., Плоппер Д.), Лаборатория знаний, Москва, с. 26–27.
- 47. Hoshi, T., and Lahiri, S. (2004) Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Cell Biol.*, **306**, 2050–2051, doi: 10.1126/science.1107069.
- 48. Haddad, G., and Jiang, C. (1997) O<sub>2</sub>-sensing mechanisms in excitable cells: role of plasma membrane K<sup>+</sup> channels, *Annual Rev. Physiol.*, **59**, 23–42, doi: 10.1146/annurev. physiol.59.1.23.
- Kemp, P., and Peers. C (2007) Oxygen sensing by ion channels, Essays Biochem., 43, 77–90, doi: 10.1042/ BSE0430077.
- 50. Platoshyn, O., Brevnova, E., Burg, E., Yu, Y., Remillard, C., and Yuan, J. (2006) Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C907–C916, doi: 10.1152/ajpcell.00028.2005.
- 51. Prabhakar, N.R., and Peers, C. (2014) Gasotransmitter regulation of ion channels: a key step in O<sub>2</sub> sensing by the carotid body, *Physiology (Bethesda)*, **29**, 49–57, doi: 10.1152/physiol.00034.2013.
- Peers, C., Wyatt, C., and Evans, A. (2010) Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 174, 292–298, doi: 10.1016/j.resp.2010.08.010.
- 53. Kemp, P. (2006) Detecting acute changes in oxygen: will the real sensor please stand up? *Exp. Physiol.*, **91**, 829–834, doi: 10.1113/expphysiol.2006.034587.
- 54. Ward, J. (2008) Oxygen sensors in context, *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 1–14, doi: 10.1016/j.bbabio.2007. 10.010.
- 55. Williams, S., Wootton, P., Mason, H., Bould, J., Iles, D., Riccardi, D., Peers, C., and Kemp, P. (2004) Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel, *Science*, **306**, 2093–2097, doi: 10.1126/science.1105010.
- 56. Hou, S., Heinemann, S., and Hoshi, T. (2009) Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules, *Physiology (Bethesda)*, **24**, 26–35, doi: 10.1152/physiol.00032.2008.
- Peng, Y., Nanduri, J., Raghuraman, G., Souvannakitti, D., Gadalla, M., Kumar, G., Snyder, S., and Prabhakar, N. (2010) H<sub>2</sub>S mediates O<sub>2</sub> sensing in the carotid body, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10719–10724, doi: 10.1073/pnas.1005866107.
- Li, Q., Sun, B., Wang, X., Jin, Z., Zhou, Y., Dong, L., Jiang, L., and Rong, W. (2010) A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels, *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 1179–1189, doi: 10.1089/ars.2009.2926.

62 ВЁТОШ

59. Peers, C. (2015) Acute oxygen sensing-inching ever closer to an elusive mechanism, *Cell Metab.*, **22**, 753–754, doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.011.

- 60. Julius, D., and Nathans, J. (2012) Signaling by sensory receptors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4, a005991, doi: 10.1101/cshperspect.a005991.
- 61. Maines, M. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 517–554.
- Prabhakar, N., Dinerman, J., Agani, F., and Snyder, S. (1995) Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1994–1997.
- Prabhakar, N. (2012) Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in hypoxic sensing by the carotid body, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **184**, 165–169, doi: 10.1016/j.resp.2012.05.022.
- 64. Barbé, C., Al-Hashem, F., Conway, A., Dubuis, E., Vandier, C., and Kumar, P. (2002) A possible dual site of action for carbon monoxide-mediated chemoexcitation in the rat carotid body, *J. Physiol.*, 543, 933–945, doi: 10.1113/jphysiol.2001.015750.
- Lloyd, B., Cunningham, D., and Goode, R. (2013) in Arterial Chemoreceptors (Torrance, R., ed.), Blackwell, Oxford, pp. 145–150.
- Gadalla, M., and Snyder, S. (2010) Hydrogen sulfide as a gasotransmitter, *J. Neurochem.*, 113, 14–26, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x.
- 67. Wang, R. (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed, *Physiol. Rev.*, **92**, 791–896, doi: 10.1152/physrev.00017.2011.
- Mkrtchian, S., Kåhlin, J., Ebberyd, A., Gonzalez, C., Sanchez, D., Balbir, A., Kostuk, E., Shirahata, M., Fagerlund, M., and Eriksson, L. (2012) The human carotid body transcriptome with focus on oxygen sensing and inflammation – a comparative analysis, *J. Physiol.*, 590, 3807–3819, doi: 10.1113/jphysiol.2012.231084.
- Makarenko, V., Nanduri, J., Raghuraman, G., Fox, A., Gadalla, M., Kumar, G., Snyder, S., and Prabhakarn, N. (2012) Endogenous H<sub>2</sub>S is required for hypoxic sensing by carotid body glomus cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 303, C916–C923, doi: 10.1152/ajpcell.00100.2012.
- Buckler, K. (2012) Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells, *Pflug. Arch.*, 463, 743–754, doi: 10.1007/s00424-012-1089-8.
- 71. Haouzi, P., Bell, H., and Van de Louw, A. (2011) Hypoxia-induced arterial chemoreceptor stimulation and hydrogen sulfide: too much or too little? *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **179**, 97–102, doi: 10.1016/j.resp.2011.09.009.
- Olson, K., and Whitfield, N. (2010) Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 1219–1234, doi: 10.1089/ars.2009.2921.
- 73. Campanucci, V., and Nurse, C. (2007) Autonomic innervation of the carotid body: role in efferent inhibition, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **157**, 83–92, doi: 10.1016/j.resp.2007.01.020.
- Prabhakar, N., Kumar, G., Chang, C., Agani, F., and Haxhiu, M. (1993) Nitric oxide in the sensory function of the carotid body, *Brain Res.*, 625, 16–22.
- 75. Silva, J., and Lewis, D. (2002) Nitric oxide enhances Ca(2+)-dependent K(+) channel activity in rat carotid body cells, *Pflugers Arch.*, **443**, 671–675, doi: 10.1007/s00424-001-0745-1.
- Summers, B., Overholt, J., and Prabhakar, N. (1999) Nitric oxide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism, *J. Neurophysiol.*, 81, 1449–1457, doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1449.

- 77. Li, Y., Zheng, H., Ding, Y., and Schultz, H. (2010) Expression of neuronal nitric oxide synthase in rabbit carotid body glomus cells regulates large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium currents, *J. Neurophysiol.*, 103, 3027–3033, doi: 10.1152/jn.01138.2009.
- Campanucci, V., Zhang, M., Vollmer, C., and Nurse, C. (2006) Expression of multiple P2X receptors by glossopharyngeal neurons projecting to rat carotid body O<sub>2</sub>-chemoreceptors: role in nitric oxide-mediated efferent inhibition, *J. Neurosci.*, 26, 9482–9493, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1672-06.2006.
- Колесникова Е.Э. (2004) Молекулярные механизмы рецепции уровня кислорода, *Нейрофизиология*, 36, 330—347.
- Samanta, D., Prabhakar, N., and Semenza, G. (2017) Systems biology of oxygen homeostasis, *Wiley Interdiscip*. *Rev. Syst. Biol. Med.*, 9, e1382, doi: 10.1002/wsbm.1382.
- 81. Semenza, G. (2010) Oxygen homeostasis, Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med., 2, 336–361, doi: 10.1002/wsbm.69.
- 82. Szewczak, Ĺ. (2016) Timeline: cellular oxygen sensing, *Cell*, **167**, 286, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.065.
- 83. Lin, F., Suggs, S., Lin, C., Browne, J., Smalling, R., Egrie, J., Chen, K., Fox, G., Martin, F., and Stabinsky, Z. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580–7584.
- 84. Bishop, T., and Ratcliffe, P. (2014) Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives, *Hypoxia (Auckl)*, **2**, 197–213, doi: 10.2147/HP.S47598.
- 85. Gleadle, J. (2009) Review article: How cells sense oxygen: lessons from and for the kidney, *Nephrology (Carlton)*, 1, 86–93, doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01064.x.
- 86. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. (2010) Механизмы регуляции транскрипционного фактора при гипоксии, *Биохимия*, **75**, 185—195.
- 87. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P., and Pugh, C. (2001) Ratcliffe, P. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation, *EMBO J.*, **20**, 5197–5206, doi: 10.1093/emboj/20.18.5197.
- 88. Maxwell, P., Wiesener, M., Chang, G., Clifford, S., Vaux, E., Cockman, M., Wykoff, C., Pugh, C., Maher, E., and Ratcliffe, P. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, 399, 271–275, doi: 10.1038/20459.
- Semenza, G. (2016) Dynamic regulation of stem cell specification and maintenance by hypoxia-inducible factors, *Mol. Aspects Med.*, 47–48, 15–23, doi: 10.1016/j.mam.2015.09.004.
- Prabhakar, N., and Semenza, G. (2016) Regulation of carotid body oxygen sensing by hypoxia-inducible factors, *Pflug. Arch.*, 468, 71–75, doi: 10.1007/s00424-015-1719-z.
- 91. Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K., and Myllyharju, J. (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor, *J. Biol. Chem.*, **278**, 30772–30780, doi: 10.1074/jbc. M304982200.
- 92. Maltepe, E., Schmidt, J., Baunoch, D., Bradfield, C., and Simon, M. (1997) Abnormal Angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT, *Nature*, **386**, 403–407, doi: 10.1038/386403a0.
- 93. Townley-Tilson, W., Pi, X., and Xie, L. (2015) The role of oxygen sensors, hydroxylases, and HIF in cardiac function and disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 676893, doi: 10.1155/2015/676893.
- 94. Epstein, A., Gleadle, J., McNeill, L., Hewitson, K., O'Rourke, J., Mole, D., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M., Dhanda, A., Tian, Y., Masson, N., Hamilton, D., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P., Pugh, C.,

- Schofield, C., and Ratcliffe, P. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*, **107**, 43–54.
- 95. Coleman, M.L., and Ratcliffe, P.J. (2007) in *Essays in Biochemistry. Oxygen Sensing and Hypoxia-Induced Responses*, (Peers. C., ed.), Portland Press, London, pp. 1–15.
- Тренделева Т.А., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. (2014) Механизмы определения низкого уровня кислорода у млекопитающих и дрожжей и их адаптационные ответы, *Биохимия*, 79, 944—956.
- 97. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. (2015) Особенности экспрессии HIF-1α в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при гипоксии, Бюлл. эксп. биол. мед., **159**, 333—335.
- 98. Ivan, M., and Kaelin, W.G. Jr., (2017) The EGLN-HIF O<sub>2</sub>-sensing system: multiple inputs and feedbacks, *Mol. Cell*, **66**, 772–779, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.002.
- Cell, 66, 772–779, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.002.

  99. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G., and Dang, C. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia, Cell Metab., 3, 177–1785, doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.
- 100. Goda N., and Kanai M. (2012) Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism, *Int. J. Hematol.*, 95, 457–463, doi: 10.1007/s12185-012-1069-y.
- 101. Lu, H., Samanta, D., Xiang, L., Zhang, H., Hu, H., Chen, I., Bullen, J., and Semenza, G. (2015) Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, E4600–E4609, doi: 10.1073/pnas.1513433112.
- 102. Gao, L., González-Rodríguez, P., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2017) Redox signaling in acute oxygen sensing, *Redox Biol.*, 12, 908–915, doi: 10.1016/ j.redox.2017.04.033.
- 103. Fernández-Agüera, M., Gao, L., González-Rodríguez, P., Pintado, C., Arias-Mayenco, I., García-Flores, P., García-Pergañeda, A., Pascual, A., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2015) Oxygen sensing by arterial chemoreceptors depends on mitochondrial complex I signaling, *Cell Metab.*, 22, 825–837, doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.004.
- 104. Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., and Heinemann, S. (2006)

- Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-lalpha and the von Hippel-Lindau protein, *J. Physiol.*, **571**, 349–359, doi: 10.1113/jphysiol.2005.096818.
- 105. Dong, Q., Zhao, N., Xia, C., Du, L., Fu, X., and Du, Y. (2012) Hypoxia induces voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv) channel expression in pulmonary arterial smooth muscle cells through hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, 12, 158–163, doi: 10.17305/bjbms.2012.2463.
- Shin, D., Lin, H., Zheng, H., Kim, K., Kim, J., Chun, Y., Park, J., Nam, J., Kim, W., Zhang, Y., and Kim, S. (2014) HIF-1α-mediated upregulation of TASK-2 K<sup>+</sup> channels augments Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse B cells under hypoxia, *J. Immunol.*, 193, 4924–4933, doi: 10.4049/jimmunol.1301829.
  Bautista, L., Castro, M., López-Barneo, J., and
- 107. Bautista, L., Castro, M., López-Barneo, J., and Castellano, A. (2009) Hypoxia inducible factor-2alpha stabilization and maxi-K<sup>+</sup> channel beta1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: role in preconditioning, *Circ. Res.*, 104, 1364–1372, doi: 10.1161/CIRCRESAHA. 108.190645.
- 108. Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamomoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oqa, T., Kaneko, S., Suqa, S., Nokami, T., Yoshida, J., and Mori, Y. (2011) TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>, Nat. Chem. Biol., 7, 701–711, doi: 10.1038/nchembio.640.
- 109. Nagarajan, Y., Rychkov, G., and Peet, D. (2017) Modulation of TRP channel activity by hydroxylation and its therapeutic potential, *Pharmaceuticals (Basel)*, **10**, 1–8, doi: 10.3390/ph10020035.
- 110. Semenza, G., and Prabhakar, N. (2018) The role of hypoxia-inducible factors in carotid body (patho) physiology, *J. Physiol.*, **596**, 2977–2983, doi: 10.1113/JP275696.
- 111. Macdonald, A., and Vjotosh, A. (1999) Patch-clamp recording of  $BK_{Ca}$  channels in hyperbaric oxygen, *J. Physiol.*, **518**, 111P–112P.
- 112. Pokorski, M., Takeda, K., and Okada, Y. (2016) Oxygen sensing mechanisms: a physiological penumbra, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **952**, 1–8, doi: 10.1007/5584\_2016\_67.
- 113. Mori, Y., Takahashi, N., Kurokawa, T., and Kiyonaka, S. (2017) TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O<sub>2</sub> sensing, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **93**, 464–482, doi: 10.2183/pjab.93.028.

# INTRACELLULAR MECHANISMS OF OXYGEN SENSING

#### **Review**

### A. N. Vjotosh<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, 194223 St. Petersburg, Russia; E-mail: vjotnn@yahoo.com

Lesgaft National State University of Physical Education, Sport and Health, 190121 St. Petersburg, Russia
 Mechnikov North-Western State Medical University, 195067 St. Petersburg, Russia

Received May 9, 2019 Revised September 29, 2019 Accepted October 20, 2019

Based on the analysis of literature data, molecular mechanisms for oxygen sensing in various compartments of animal cells are postulated. Several ways for intracellular sensory oxygen transduction are suggested. Functioning of the nearmembrane and cytoplasmic pools of molecular constructs of cells under hypoxia is considered. Role of mitochondria in cell sensitivity toward a decrease in oxygen content is discussed. Interrelationship of the operational and chronic intracellular mechanisms of perception of negative gradients of molecular oxygen concentration, as well as their relationship with cell response to oxidative stress, is revealed.

Keywords: mitochondria, potassium membrane channels, HIF

УДК 577.218

# ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР KLF2 И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

# Обзор

© 2020 К.Т. Турпаев

Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kyril.turpaev@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.05.2019 После доработки 02.08.2019 Принята к публикации 07.10.2019

КLF2 входит в семейство Кгüppel-подобных факторов транскрипции из обширной группы ДНК-связывающих белков с консервативными доменами, известными как цинковые пальцы. КLF2 участвует в дифференцировке и регуляции функциональной активности моноцитов и Т-лимфоцитов, адипоцитов и клеток сосудистого эндотелия. Активность KLF2 контролирует несколько регуляторных систем: МАР-киназный каскад МЕКК2,3/МЕК5/ЕRК5/МЕF2, G-белки семейства Rho, гистонацетилтрансферазы СВР и р300 и гистондеацетилазы НDAC 4 и HDAC 5. Активация KLF2 в эндотелиальных клетках вызывает индукцию eNOS и имеет вазодилатационный эффект. Действие многих зависимых от KLF2 генов направлено на подавление коагуляции крови, агрегации Т-клеток и макрофагов с сосудистым эндотелием, что препятствует развитию атеросклероза. Активация KLF2 оказывает двоякое воздействие на спектр экспрессируемых генов. KLF2 индуцирует значительное число генов и подавляет транскрипцию генов зависимых от NF-кВ. Транскрипционные факторы KLF2 и NF-кВ проявляют себя как взаимные антагонисты. KLF2 снижает активность NF-кВ, тогда как NF-кВ подавляет транскрипцию гена *KLF2*. Зависимое от KLF2 подавление экспрессии контролируемых NF-кВ генов ослабляет ответ клеток на про-воспалительные цитокины IL-1β и TNFα и развитие воспалительных процессов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** KLF2, цинковые пальцы, регуляция транскрипции, про-воспалительные цитокины, эндотелий.

**DOI:** 10.31857/S0320972520010054

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА КLF

Транскрипционные факторы KLF (Krüppellike factors) названы так по структурной близости ДНК-связывающих доменов с аналогичным доменом обнаруженного ранее у дрозофилы ге-

Принятые сокращения: АМРК – АМР-зависимая протеинкиназа; CaMK — кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа; eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота; ERK5 - активируемая внеклеточными сигналами протеинкиназа 5 (extracellular signal-regulated kinase 5); HDAC – гистондеацетилаза; HO-1 – гемоксигеназа 1; ICAM-1 — молекула межклеточной адгезии 1 типа (inter-cellular adhesion molecule 1); KLF - Krüppel-подобный транскрипционный фактор (Krüppel-like factor); MAP – активируемый митогенами белок (mitogen-activated protein); MEF2 – миоцитарный энхансерный фактор 2 (myocyte enhancer factor 2); MEK5 — киназа MAP-киназ 5 (MAP kinase kinase 5); MEKK – киназа киназ MAP-киназ (MAP kinase kinase kinase); PECAM-1 — молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1); VCAM-1 - молекула адгезии клеток эндотелия сосудов 1 (vascular cell adhesion molecule 1); VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR – рецептор VEGF.

на *Krüppel*, который контролирует сегментацию эмбриона, и мутации по этому гену вызывают значительные морфологические нарушения и летальны (нем. Krüppel, калека) [1]. Факторы семейства КLF имеются у всех многоклеточных животных и контролируют широкий спектр внутриклеточных процессов. Первый из этих факторов, обозначенный как ЕКLF (впоследствии KLF1), был обнаружен в эритроидных клетках в 1993 г. К настоящему времени установлено 17 членов семейства KLF. Для факторов KLF характерно наличие консервативных С-концевых доменов (~80 аминокислот), известных как цинковые пальцы. Подобные структуры содержат транскрипционные факторы родственных KLF семейств Sp (1-9) (Specificity Proteins) и EGR (1–4) (Early Growth Response), WT1 (Wilms Tumor Protein 1), YY1 (vin yang 1), СТСГ и ряд других белков [2, 3]. Факторы КLF и Sp распознают близкие или одинаковые по структуре GC-богатые нуклеотидные последовательности и, по-видимому, могут конкурировать за связывание с промоторами зависимых

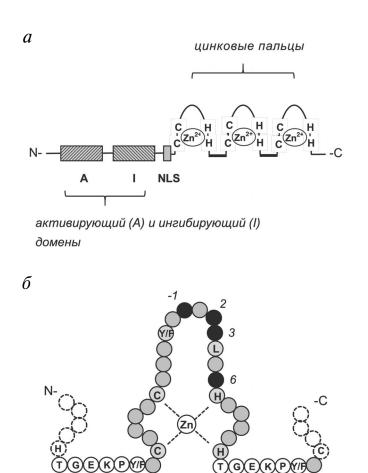
генов [3, 4]. Все белки, входящие в семейства KLF и Sp, содержат по три цинковых пальца, каждый из которых состоит из 21-23 аминокислот. Цинковые пальцы факторов KLF и Sp имеют следующую структуру: CysX<sub>4</sub>CysX<sub>12</sub>HisX<sub>3</sub>His (Х – любая аминокислота). Сходство аминокислотных последовательностей ДНК-связывающего домена Sp1-подобных факторов и факторов семейства КLF составляет >65% [3, 5]. Аминокислотные остатки цинковых пальцев образуют α-спиральную структуру, которая стабилизирована координационными связями ионов  $Zn^{2+}$ . Между пальцами расположены вставки из 7 аминокислот с высоко консервативной структурой TGEKP(Y/F)X. При связывании с ДНК три аминокислоты (-1, +3 и +6 по нумерации)α-спирали) каждого из цинковых пальцев вступают в контакт с тремя последовательно расположенными нуклеотидными парами. Аминокислоты +2 и +6 соседних α-спиральных структур взаимодействуют с нуклеотидами одной пары, и тем самым 12 аминокислот ДНК-связывающего домена образуют контакты с 10 нуклеотидными парами (рис. 1) [5]. Эти аминокислоты определяют избирательность взаимодействия разных представителей семейства KLF со своими участками связывания на ДНК. Контролируемые факторами KLF регуляторные последовательности сформированы фрагментами ДНК в двух основных вариантах: САССС или СССАС (GT-box) и CGCCC или CCCGC (GC-box). Повидимому, факторы семейства KLF конкурируют между собой за связывание с одинаковыми регуляторными последовательностями, однако этот вопрос недостаточно исследован [3, 4, 6-8]. Наряду с ДНК-связывающим доменом факторы KLF содержат консервативную аминокислотную последовательность, обеспечивающую ядерную локализацию этих белков. У разных факторов КLF такие структуры расположены либо между цинковыми пальцами, либо примыкают к N-концевому цинковому пальцу (как, например, у KLF2 и KLF4) [6].

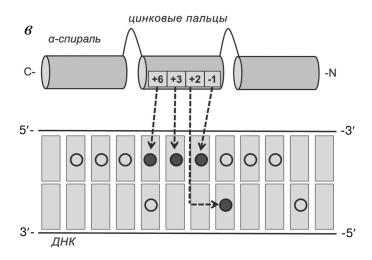
Факторы КLF сильно различаются по *N*-концевым аминокислотным последовательностям, которые отвечают за взаимодействие с другими белками и предопределяют функциональные различия между разными факторами KLF [6, 8]. Некоторые факторы KLF участвуют в регуляции одних и тех же внутриклеточных процессов, при этом оказывая на них противоположное воздействие. Например, в жировой ткани KLF2, KLF3 и KLF7 подавляют дифференцировку преадипоцитов в зрелые адипоциты, тогда как KLF4, KLF5, KLF6 и KLF15 стимулируют этот процесс, что может быть связано с активацией экспрессии фактора PPARу [6, 9]. В

эритроидных клетках KLF2, KLF5 и KLF15 индуцируют, тогда как KLF8 подавляет экспрессию у-глобина [10]. По своим функциональным характеристикам, которые коррелируют со структурными различиями, факторы KLF можно разделить на три основные группы. В 1-ю группу входят факторы KLF3, KLF8 и KLF12; их действие направлено исключительно на подавление транскрипции. Во 2-ю группу – KLF1, KLF2 и KLF4-KLF7; они активируют транскрипцию зависимых генов. В 3-ю группу входят KLF9-KLF11, KLF13, KLF14 и KLF16; они способны как активировать, так и подавлять транскрипцию зависимых генов (рис. 2) [3]. Характер действия KLF15 и KLF17 остается невыясненным. Транскрипционный эффект KLF 3-й группы зависит от структуры промоторных областей контролируемых ими генов и от типа клеток. Так, например, KLF13 подавляет СҮР1А1 (цитохром Р450) в клетках СНО, но активирует транскрипцию гена *CCL5* (цитокин RANTES) в Т-клетках [11, 12]. Экспрессия факторов KLF происходит во всех (KLF6–KLF11 и KLF13–KLF16) или во многих тканях [3, 7]. Генетическая инактивация факторов KLF1-KLF7 летальна уже на ранних стадиях эмбриогенеза или в раннем постнатальном периоде [3].

Зависимая от ряда КLF 2-й и 3-й арупп (КLF1, KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF11, KLF13) активация транскрипции сопряжена с образованием комплексов этих факторов с гистонацетилтрансферазами СВР, р300 и РСАГ. Для активации КLF необходимо их ацетилирование. У KLF1 за связывание с кофакторами СВР, р300 и РСАГ отвечают домены, обозначаемые как ЕКLFTAD (1 и 2), которые содержат консервативную последовательность ФDХФФ (Ф — гидрофобные аминокислоты). Эти домены также участвуют в связывании KLF1 с общим фактором транскрипции TFIIH, который входит в состав большого РНК-полимеразного комплекса [13, 14].

Подавление транскрипции под действием KLF обусловлено связыванием деацетилаз. Факторы KLF3, KLF8 и KLF12, будучи связанными с ДНК, образуют многокомпонентные комплексы с транскрипционными корепрессорами CtBP1 или CtBP2 (C-terminal Binding Protein, что указывает на связывание CtBP с Cконцевым участком аденовирусного белка Е1А). Связывание происходит через N-концевые домены факторов KLF, содержащие консервативаминокислотную последовательность PXDLS. За исключением этого фрагмента между N-концевыми доменами перечисленных факторов нет заметных гомологий. Обусловленное CtBP подавление транскрипции основано на 66 ТУРПАЕВ





**Рис. 1.** Структура фактора КLF2 и схема его контактов с регуляторной последовательностью ДНК. a — Примерное расположение функциональных доменов на полипептидной цепи KLF2. Показаны расположенные тандемом три C-концевые цинковые пальца, каждый из которых связывает один ион  $Zn^{2+}$ . Аналогичную структуру имеют родственные KLF2 факторы KLF1 и KLF4.  $\delta$  — Примерная структура второго цинкового пальца. Аминокислотные остатки, которые образуют контакты с нуклеотидами участка связывания ДНК, выделены черным цветом и перенумерованы по своему положению в  $\alpha$ -спиральной структуре. Для KLF2 и всех транскрипционных факторов семейства KLF — это Arg (—1), Asp (+2), Glu (+3) и Arg (+6). Обозначены консервативные для всех KLF аминокислоты. e — Взаимодействие  $\alpha$ -спиральных структур, образуемых цинковыми пальцами, с ДНК. Приведена нумерация аминокислотных остатков, которые вступают в контакт с ДНК. Аминокислота в позиции +2 вступает в контакт с нуклеотидны, образующие участок связывания KLF2 (10 нуклеотидных пар). Заштрихованными кружками помечены нуклеотиды, вступающие в контакт с аминокислотами 2-го цинкового пальца. Сокращение: NLS — сигнал ядерной локализации

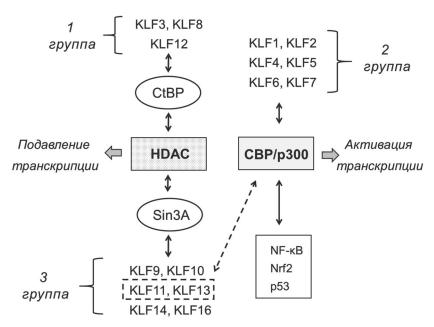


Рис. 2. Классификация факторов КLF. Входящие в семейство КLF транскрипционные факторы распределены по трем группам: 1-я группа) — KLF, содержащие участок связывания с адаптерными белками CtBP, участвующий в дальнейшем формировании комплекса с HDAC; 2-я группа) — KLF, взаимодействующие с гистонацетилтрансферазами CBP и р300; 3-я группа) — KLF, содержащие участок связывания с Sin3A, который также образует комплекс с HDAC. Два фактора KLF 3-й группы (KLF11 и KLF13) также могут взаимодействовать с CBP и р300

последующем формировании многокомпонентного комплекса с Zn<sup>2+</sup>-зависимыми гистондеацетилазами HDAC4 и HDAC5 (подгруппа IIa). Под действием HDAC происходит изменение баланса между ацетилированными и неацетилированными гистонами и другими ДНК-связывающими белками, что меняет структуру хроматина и влияет на транскрипцию генов [15]. Ингибирование транскрипции факторами KLF 3-й группы (KLF9, KLF10, KLF11, KLF13, KLF14 и KLF16) основано на связывании адаптерного белка Sin3A и последующим присоединением HDAC. Связывание адаптерного Sin3A с KLF происходит по консервативному участку SID [4, 8]. НDAC также деацетилируют негистоновые белки, в частности транскрипционные факторы р65/NF-кВ и р53, что приводит к снижению их активности [16].

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРА KLF2. ГОМОЛОГИЯ KLF2 И KLF4

*KLF2* был обнаружен в 1995 г. в геноме мыши при поиске генов, имеющих цинк-связывающие домены, гомологичные имеющемуся в обнаруженном ранее гене *KLF1*. Самый высокий уровень экспрессии KLF2 был выявлен в легочной ткани, и поэтому его первоначальное обозначение — LKLF (Lung KLF) [17]. Экспрессия KLF2

также происходит в селезенке, сердце, тимусе, жировой ткани, скелетных мышцах, сосудистом эндотелии, клетках миелоидного и лимфоидного ряда. KLF2 участвует в клеточной дифференцировке и регуляторных процессах в иммунной и кровеносной системах легочной и жировой тканей [18, 19]. Фактор KLF2, наряду с KLF4 и KLF5, имеет значение для поддержания эмбриональных клеток в состоянии плюрипотентности. Гиперэкспрессия этих факторов способствует перепрограммированию дифференцированных клеток в плюрипотентные. KLF4 входит в число факторов Яманаки, которые критически необходимы для генерации индуцированных стволовых клеток. ОСТ4, один из факторов Яманаки, контролирует экспрессию KLF2 [6, 20, 21].

Фактор KLF4 из всех представителей семейства KLF наиболее близок структурно и функционально с KLF2. Экспрессия фактора KLF4 имеет близкую тканевую специфичность с KLF2 и характерна для эндотелия сосудов, лимфоидных клеток, эпителиальных клеток кожи, кишечника, почек и легких [20, 22]. Основные активаторы гена KLF2 (гидродинамическое сопротивление, статины, ресвератрол — см. ниже) также индуцируют ген KLF4. В клетках сосудистого эндотелия KLF2 и KLF4 стимулируют экспрессию эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS), тромбомодулина (THBD) и гемоксигеназы 1 (HO-1) [18, 23]. KLF2 и KLF4 связыва-

68 ТУРПАЕВ

ются с участками ДНК, содержащими последовательности типа САССС [18]. Наряду с ДНКсвязывающим КLF2 содержит активирующий транскрипцию *N*-концевой домен (аминокислотные остатки 1–110) (рис. 1). Также KLF2 содержит ингибиторный домен (остатки 111–267), по которому происходит присоединение убиквитинлигаз WWP1 и FBW7, что приводит к протеолитической деградации KLF2 [24, 25].

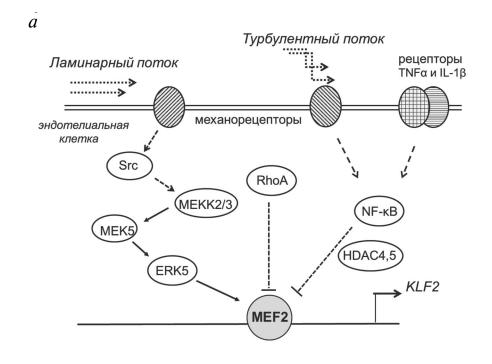
### УСЛОВИЯ АКТИВАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ KLF2

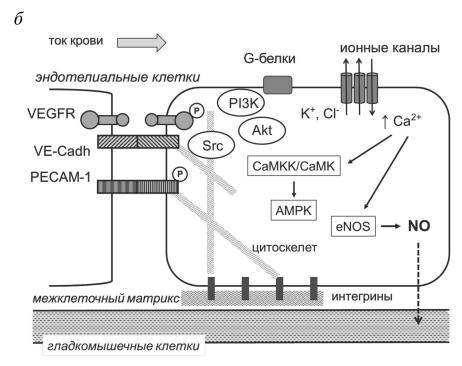
Регуляция фактора KLF2 основана, прежде всего, на изменении его экспрессии. Промоторная область гена KLF2 обогащена нуклеотидными парами GC и содержит несколько участков связывания факторов транскрипции EGR1, Sp1 и семейства KLF. В клетках эндотелия решающее значение для экспрессии гена *KLF2* имеет участок промоторной последовательности —141/—103 от начала транскрипции [26]. Этот фрагмент ДНК связывает транскрипционный фактор MEF2 (миоцитарный энхансерный фактор 2, myocyte enhancer factor 2). Обобщенная структура участка связывания MEF2: YTA(A/T)<sub>4</sub>TAR. Активность MEF2 контролирует митоген-активируемая протеинкиназа ERK5 (синонимы -BMK1, Big MAP Kinase) [27]. ERK5 и контролирующие ее протеинкиназы образуют четвертый, и если сравнивать с ERK1/2, JNK и р38, менее изученный МАР-киназный каскад. Фосфорилирование (по остаткам Thr218 и Tyr220) и активацию ERK5 осуществляет двойная треонин-тирозиновая киназа МЕК5 (синоним – МАР2К5). Известны две изоформы МЕК5, которые образуются при альтернативном сплайсинге. В свою очередь, активность МЕК5 контролируют двойные серин-треониновые киназы МЕКК2 и МЕККЗ (синонимы – МАРЗК2 и МАРЗК3 соответственно), которые фосфорилируют МЕК5 по аминокислотным остаткам Ser311 и Thr315 (рис. 3, а) [27, 28]. Наряду с МЕГ2 субстратами ERK5 служат регуляторные белки Sap1, с-Fos и с-Мус. После активации ERK5 производит фосфорилирование собственной полипептидной цепи по Thr732 и нескольким С-концевым остаткам серина. В результате происходит высвобождение ERK5 из комплекса с HSP90 и перемещение в клеточное ядро. Фосфорилирование ERK5 по остатку Thr732 также производит зависимая от ростовых факторов МАР киназа ERK1/2 [28, 29].

Наиболее полно молекулярный механизм индукции транскрипции гена *KLF2* исследован

в клетках сосудистого эндотелия, где он происходит под действием гидродинамических факторов. Основные функции эндотелия состоят в формировании барьера между кровью и тканями, регуляции тонуса сосудов, мобилизации клеток иммунной системы, контроле процессов свертывания крови и ангиогенеза. KLF2 vчаствует во всех этих процессах. Выстилая стенки кровеносных сосудов, клетки эндотелия не образуют на них идеально ровную поверхность. При длине 20–150 мкм вблизи ядра их толщина составляет 3-5 мкм и на периферии - <1 мкм. Люминальная мембрана клеток эндотелия формирует гликокаликс, характерную ультраструктуру, состоящую из гликопротеинов и гликолипидов. Между током крови и эндотелием происходит механическое взаимодействие трех основных видов: гидродинамическое сопротивление стенок сосуда движению крови (также известное как напряжение сдвига, shear stress), гидростатическое давление крови и связанная с ним растяжения кровеносных (рис. 4, a) [18, 30–32]. При ламинарном течении, когда все слои потока крови перемещаются параллельно стенкам сосудов, сила гидродинамического сопротивления пропорциональна скорости кровотока и обратно пропорциональна R<sup>4</sup> (формула Пуазейля; R – радиус кровеносного сосуда). Сила гидродинамического сопротивления наиболее велика в небольших артериолах  $(10-70 \text{ дин/см}^2)$  и менее всего выражена в крупных венах (~1 дин/см²). Сила растяжения стенок сосудов или тангенциального напряжения пропорциональна гидростатическому давлению и обратно пропорциональна R (формула Лапласа). После сердечного сокращения сила растяжения превышает 104 дин/см<sup>2</sup> и превосходит гидродинамическое сопротивление более чем в 100 раз. Турбулентное течение, при котором поток крови перемещается не только параллельно стенкам сосудов, но и в других направлениях, происходит при сужении артерий, их изгибах, ветвлении, а также при патологических процессах (рис. 4, б) [32–35]. В клетках эндотелия индукция гена KLF2 происходит при ламинарном течении крови и, соответственно, высоких значениях напряжения сдвига. В модельных экспериментах на клетках HUVEC показано, что пульсирующий ламинарный поток, в большей степени воспроизводящий физиологические условия, вызывает больший рост уровня KLF2, чем стационарный поток [30, 32, 34].

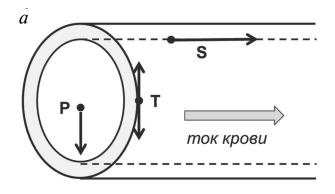
В клетках эндотелия рецепцию гидродинамического сопротивления и трансформацию механического сигнала в биохимический осуществляет целый ряд регуляторных систем и клеточных компонентов. К ним относятся ион-

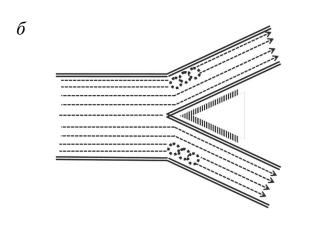


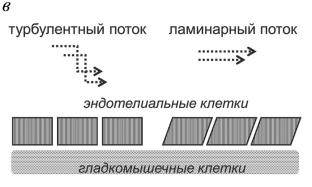


**Рис. 3.** Молекулярный механизм регуляции KLF2 в клетках сосудистого эндотелия. a — Общая схема регуляции KLF2 в эндотелиальных клетках: активация при ламинарном и подавление при турбулентном токах крови. Экспрессию гена KLF2 активирует транскрипционный фактор MEF2. Транскрипцию гена KLF2 подавляют сигнальные системы RhoA и NF-кВ. Активация NF-кВ происходит при турбулентном токе крови и под действием про-воспалительных цитокинов. Ингибирующее действие NF-кВ на транскрипцию гена KLF2 обусловлено HDAC 4 и 5. Показанное на рисунке расположение механорецепторов на люминальной стороне эндотелия достаточно условно.  $\delta$  — Механосенсоры и сигнальные системы, активация которых происходит при ламинарном токе крови. Быстрый и кратковременный ответ на напряжение сдвига состоит в последовательном открывании  $K^+$  и  $Cl^-$  ионных каналов, повышении внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , активации eNOS и зависимом от NO расслаблении гладкомышечных клеток. Также рост концентрации  $Ca^{2+}$  вызывает активацию  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ  $CaMKK\beta$  и CaMK и контролируемой ими CaMK долговременный ответ опосредован изменением конформации мембранных белков CaMKK и CaMK и Ca

70 ТУРПАЕВ







**Рис. 4.** Обобщенная схема гемодинамики кровеносных сосудов. a — Силы, действующие на стенки артериальных сосудов: гидростатическое давление, направленное перпендикулярно стенкам сосуда (P), тангенциальное напряжение, растягивающее стенки сосуда (T), и направленная вдоль потока сила трения крови о стенки сосуда (S).  $\delta$  — Зона турбулентности, возникающая при ветвлении и изгибе артериальных сосудов. В зоне турбулентности, которая обозначена пунктирными кругами, гидродинамическое сопротивление снижено. В противоположной области, в зоне с большей дугой изгиба (отмечена штриховкой), гидродинамическое сопротивление повышено. a — Схема деформирующего действия ламинарного потока на клетки эндотелия

ные каналы, интегрины, G-белки, рецепторы VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) — VEFGR2 и VEFGR3, белки клеточной адгезии — VE-кадгерин и иммуноглобулин-подобный бе-

лок PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) [36]. Ранний ответ клеток на возрастание гидродинамического сопротивления состоит в обусловленной открытием К+ каналов гиперполяризации мембран, которая вызывает открытие плазматических Ca<sup>2+</sup> каналов. Впоследствии мембранный потенциал выравнивается открытием Cl<sup>-</sup> каналов. По-видимому, ионные каналы обеспечивают быструю и кратковременную реакцию клеток на изменения гидродинамического сопротивления, сила которого периодически меняется из-за пульсирующего характера тока крови. Рост концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> активирует eNOS и стимулирует образование оксида азота и вызывает последуюшее расширение кровеносных сосудов [37, 38].

Из всех механосенсорных комплеков, участвующих в реализации долговременного ответа клеток на высокое гидродинамическое сопротивление, наиболее полно изучена многокомпонентная система, в которую входят трансмембранные белки PECAM-1, VE-кадгерин и VEGFR2/3, локализованные в зоне контактов между эндотелиальными клетками [36]. Под действием силы трения крови о стенки сосудов происходит изменение морфологии клеток эндотелия и механической нагрузки на РЕСАМ-1 и VE-кадгерин (рис. 3,  $\delta$  и 4,  $\epsilon$ ). При этом происходит ослабление нагрузки на VE-кадгерин и усиление – на РЕСАМ-1. Последующее изменение конформации РЕСАМ-1 способствует образованию контакта между ним и виментином, белком, участвующим в построении цитоскелета, а также образование комплекса VE-кадгерина с VEGFR2/3. Далее происходит активация одной из тирозиновых киназ семейства src, фосфорилирование PECAM-1 и VEGFR2/3 по остаткам тирозина, активация протеинкиназы Akt и зависимых внутриклеточных сигнальных систем (рис. 3). Также происходят изменения активности G-белков: снижение Rho и увеличение активности Rac [36-40].

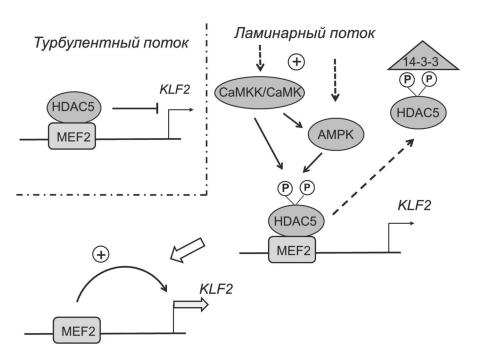
Дополнительным фактором, контролирующим экспрессию гена KLF2, является транскрипционный репрессор НДАС5. В эндотелиальных клетках в условиях турбулентного течения крови и при низких значениях гидродинамического сопротивления HDAC5 находится в комплексе со связанным с ДНК фактором MEF2 и подавляет транскрипцию KLF2. При ламинарном течении крови и высоких значениях гидродинамического сопротивления (>10 дин/см<sup>2</sup>) в клетках эндотелия происходит активация кальций-кальмодулин-зависимых протеинкиназ (CaMK), которые фосфорилируют HDAC5 по остаткам Ser259 и Ser498, что вызывает диссоциацию ее из комплекса с MEF2. Далее с участием фактора 14-3-3 происходит перемещение HDAC5 из ядра в цитоплазму (рис. 5) [41]. В отличие от ламинарного потока, турбулентный ток крови стимулирует экспрессию чувствительных к стрессу и про-воспалительным стимулам транскрипционных факторов NF-кВ, AP-1 и EGR-1. При этом функцию механорецепторов выполняют, по-видимому, интегрины. В дальнейшей передаче сигнала участвуют G-белки  $G\alpha_{13}$  и RhoA, протеинкиназы JNK, PKC $\zeta$  и p90RSK и транскрипционный кофактор YAP. Серин-треониновая киназа p90RSK подавляет активность ERK5 через фосфорилирование по остатку Ser496 [31, 34, 36].

В клетках эндотелия при высоких значениях гидродинамического сопротивления, наряду с индукцией гена *KLF2*, происходит активация и ядерная транслокация фактора транскрипции Nrf2, который контролирует экспрессию генов, повышающих устойчивость клеток к эндогенным и экзогенным электрофильным соединениям. Активность Nrf2 контролирует репрессорный белок Keap1, который действует как рецептор электрофильных соединений и адаптерный белок убиквитинлигазы Cul3. Окисление или алкилирование специфических тиольных групп Keap1 вызывает диссоциацию комплекса Keap1/Nrf2 и рост уровня Nrf2 в клетках

[42-44]. В эндотелии рост гидродинамического сопротивления приводит к активации Nrf2. Этот эффект обусловлен активацией липидкиназы PI3K, мембранной NAD(P)Н оксидазы и eNOS, что повышает уровень эндогенных электрофилов – активных форм кислорода и азота. В результате активации Nrf2 происходит индукция HO-1, NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы 1 (NQO1), пероксиредоксинов и других антиоксидантных генов [42, 43]. Параллельно с индукцией защитных генов Nrf2 (также как и KLF2, см. далее) участвует в негативной регуляции транскрипционного фактора NF-кВ. Ингибирующее действие основано на конкуренции между Nrf2 и NF-кВ за связывание с транскрипционными кофакторами СВР и р300 [44, 45].

#### ИНГИБИРОВАНИЕ KLF2

Подавление экспрессии KLF2 происходит под действием про-воспалительных цитокинов IL-1β и TNFα. В эндотелии экспрессию KLF2 также подавляют бактериальные эндотоксины и липопротеины низкой плотности. В клетках HUVEC ингибирующее действие TNFα опосредовано активацией фактора NF-кВ. Регуляторная область гена *KLF2* содержит несколько по-



**Рис. 5.** Схема участия HDAC5 в регуляции экспрессии KLF2 в эндотелиальных клетках. При низких значениях гидродинамического сопротивления HDAC5 находится в комплексе с MEF2 в промоторной области гена *KLF2*. При возрастании силы гидродинамического сопротивления внутриклеточная концентрация Ca<sup>2+</sup> возрастает, происходит активация протеинкиназ CaMK, фосфорилирование и высвобождение HDAC5 и активация транскрипции *KLF2*. Далее HDAC5 образует комплекс с фактором 14-3-3 и переносится из ядра в цитоплазму. Фосфорилирование HDAC5 также происходит при активации AMPK. Активность AMPK зависит от системы CaMKКβ/CaMK

72 ТУРПАЕВ

тенциальных участков связывания NF-кВ. Через посредство NF-кВ происходит присоединение гистондеацетилаз HDAC4 и HDAC5 к промоторному участку гена *KLF2* (рис. 3, a) [19, 41, 46]. В эндотелии в негативной регуляции KLF2 также участвует транскрипционный фактор FOXO1. При инкубации клеток HUVEC в среде с высоким уровнем глюкозы (30 мМ) в них происходит дефосфорилирование и активация FOXO1, что приводит к подавлению транскрипции гена KLF2 [47]. Кроме того, экспрессию гена KLF2 подавляет транскрипционный фактор р53. В промоторной области гена *KLF2* присутствует участок связывания р53, который расположен поблизости от участка связывания MEF2. Ингибирующий эффект р53 на экспрессию KLF2 опосредован связыванием гистондеацетилаз [18, 48]. В клетках HUVEC генетическая инактивация р53 вызывает повышение уровня KLF2 в клетках и индуцирует экспрессию генов eNOS и THBD. Напротив, активация р53 приводит к индукции гена *PAI-1*, экспрессию которого подавляет KLF2. Показано также, что в физиологических условиях опосредованное р53 подавление KLF2 стимулирует агрегацию тромбоцитов [48].

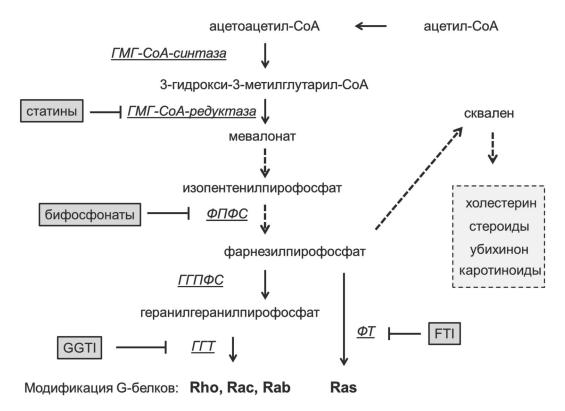
В эндотелиальных клетках в регуляции КLF2 участвует также микроРНК miR-92a, которая подавляет трансляцию мРНК *KLF2*. Экспрессия miR-92a снижена при ламинарном и возрастает при турбулентном течении крови. В свою очередь, фактор KLF2 контролирует экспрессию ряда микроРНК (например, miR-126 и miR-150) [49–52].

#### ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ KLF2

Статины в клетках разных типов активируют экспрессию KLF2 и зависимого от KLF2 гена eNOS [53, 54]. Действие статинов основано на ингибировании редуктазы 3-окси-3-метилглутарил-CoA (HMG-CoA), ключевого фермента синтеза мевалоновой кислоты, предшественника холестерина и изопреноидов (рис. 6). Как следствие, статины подавляют образование в клетках фарнезилпирофосфата и геранилгеранилпирофосфата, которые служат предшественниками для пренилирования G-белков семейств Ras, Rac, Rab и Rho по SH-группам C-концевых остатков цистеина с образованием изопренилцистеина. Такая модификация необходима для прикрепления этих белков к клеточной мембране и их функциональной активности [55]. Аналогичное со статинами воздействие на экспрессию KLF2 оказывают избирательные ингибиторы G-белков Rho и зависимой от Rho протеинкиназы ROCK. Так, например, в моноцитах линии U937 ингибитор геранилгеранилтрансферазы GGTI-298 вызывает значительную индукцию гена KLF2 [56]. В клетках разных типов под действием статинов возрастает уровень KLF2 и происходит подавление экспрессии генов, зависимых от про-воспалительных стимулов. В мо-THP-1 церивастатин подавляет ноцитах экспрессию MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) и ССК2 (C-C Chemokine Receptor 2), в эндотелии питавастатин подавляет зависимую от ΤΝ Fα индукцию молекул адгезии клеток эндотелия сосудов 1 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1), в Т-клетках статины подавляют экспрессию IFN<sub>γ</sub> [53, 57]. Статины имеют широкое клиническое применение для снижения уровня холестерина [55, 58, 59]. По-видимому, ряд дополнительных эффектов статинов, таких как подавление воспалительных процессов, обусловлен активацией KLF2 [6].

Также подавляют пренилирование G-белков и активируют экспрессию KLF2 бифосфонаты, прежде всего – азотсодержащие бифосфонаты как, например, золедроновая кислота. Показано, что золедроновая кислота активирует экспрессию KLF2 в клетках эпителиального происхождения МСГ-7 [60]. Действие бифосфонатов основано на ингибировании фарнезилпирофосфат-синтазы (рис. 6). Бифосфонаты были разработаны для лечения остеопороза. В физиологических условиях их действие ограничено остеокластами, что обусловлено прочным связыванием с гидроксиапатитом костей. Из-за отрицательного заряда бифосфонаты не проходят через плазматическую мембрану и проникают в клетки через эндоцитоз. Бифосфонаты поглощаются остеокластами при закислении ими среды и разрушении минеральной составляющей костной ткани. Подавление пренилирования регуляторных G-белков приводит к функциональной инактивации остеокластов. Кроме остеокластов бифосфонаты могут поглощаться, хотя и в меньшей степени, другими клетками моноцитарного происхождения [61].

В клетках эндотелия индукцию гена *КLF2* вызывает ресвератрол, природное полифенольное соединение [62]. Ресвератрол также стимулирует экспрессию KLF2 в культуре панкреатических β-клеток MIN6 и адипоцитах 3Т3-L1. Действие ресвератрола основано на параллельной активации транскрипционного фактора Nrf2 и NAD-зависимой лизиндеацетилазы SIRT1 (HDAC III типа). В индукции *KLF2* под действием ресвератрола участвует сигнальный каскад MEK5/MEF2 [50, 63, 64]. Активация KLF2 также происходит под действием других



**Рис. 6.** Схема синтеза производных изопрена и пренилирования G-белков. Показаны основные ингибиторы синтеза ключевых интермедиатов. Сокращения:  $\Gamma M\Gamma - 3$ -окси-3-метилглутарил;  $\Gamma \Gamma \Pi \Phi C -$  геранилгеранилпирофосфатсинтаза;  $\Gamma \Gamma \Gamma -$  геранилгеранилтрансфераза;  $\Gamma \Gamma \Gamma -$  фарнезилпирофосфатсинтаза;  $\Gamma \Gamma \Gamma -$  фарнезилтрансфераза;  $\Gamma \Gamma \Gamma -$  ГГГ (ингибитор  $\Gamma \Gamma \Gamma$ );  $\Gamma \Gamma \Gamma -$  ГГГ (ингибитор  $\Gamma \Gamma \Gamma$ )

природных биологически активных полифенолов, таких как таниновая кислота, кверцетин, рутин и экстракт фенольных соединений из морской бурой водоросли *Ecklonia cava* (т.н. сиполинол/seapolynol) [65—67]. Сиполинол подавляет дифференцировку адипоцитов линии 3Т3-L1 и накопление липидов в жировой ткани *in vivo*, что может быть связано с индукцией KLF2. Ингибирующее действие KLF2 на адипогенез обусловлено подавлением транскрипционного фактора PPAR [68].

Согласно недавно полученным данным, в клетках HUVEC экспрессию KLF2 активирует гуманин (пептид из 24 аминокислот) и фактор межклеточной сигнализации, уникальный расположением кодирующего его гена в митохондриальной ДНК (внутри гена 16S rRNA) [69]. Гуманин активирует ERK5, а также предотвращает снижение фосфорилирования ERK5 и экспрессии KLF2 при инкубации клеток HUVEC в среде, содержащей 25 мМ глюкозы. Гуманин также восстанавливает способность клеток к индукции зависимого от KLF2 гена eNOS. Инкубация клеток HUVEC в среде с высокой концентрацией глюкозы стимулирует экспрессию факторов адгезии (Е-селектин и VCAM-1) и про-воспали-

тельных цитокинов (IL-1β и TNFα). Гуманин предотвращает активацию экспрессии этих генов [70]. Индукцию KLF2 вызывает ряд других сигнальных молекул. Эритропоэтин стимулирует дифференцировку стволовых клетках ECFC (Endothelial Colony-Forming Cells) и стимулирует в них экспрессию генов *KLF2* и *eNOS*. Индуцирующее действие эритропоэтина опосредовано активацией АМР-зависимой протеинкиназы (AMPK) [71]. В клетках HUVEC экспрессию KLF2 активирует ангиопоэтин, что обусловлено активацией рецепторной тирозиновой киназы Tie2 PI3K/Akt, фактора MEF2 и не связано с активностью ERK5 [72]. В клетках моноцитарного происхождения U937 значительная индукция гена KLF2 происходит под действием химического донора оксида азота DETA-NO. При этом уровень индукции гена KLF2 под действием NO критически зависит от плотности клеток U937 в суспензионной культуре. Механизм этого эффекта неясен, известно только, что рост экспрессии KLF2 не связан с активацией ERK5 [56, 73]. Эти данные указывают на возможность регуляции образования в клетках NO по принципу положительной обратной связи: KLF2 способствует индукции eNOS и увеличению генерации 74 ТУРПАЕВ

клетками оксида азота, который, в свою очередь, вызывает транскрипционную активацию KLF2.

Из числа распространенных фармакологических препаратов индукцию гена KLF2 вызывает метформин, активатор протеинкиназы АМРК. После активации АМРК фосфорилирует HDAC5 по остатку Ser498, что вызывает ее перемещение из ядра в цитоплазму и рост транскрипции гена KLF2 (рис. 5). Кроме того, в клетках эндотелия АМРК фосфорилирует и активирует eNOS [74, 75]. Ресвератрол также активирует AMPK и eNOS. Этот эффект опосредован активацией SIRT1 [76]. В эндотелиальных клетках и моноцитах индукцию KLF2 вызывают синтетические ингибиторы HDAC, производные гидроксамовой кислоты (например, вориностат и трихостатин) [77, 78]. При действии на эндотелий вориностат подавляет зависимую от TNFa индукцию про-воспалительных генов [77]. При действии на моноциты ингибиторы HDAC препятствуют их дифференцировке, что обусловлено ингибированием HDAC4, связанной с KLF2, и проявляется в подавлении экспрессии металлопротеиназы ММР9 [78]. Ингибирующее действие гидроксаматов основано на связывании с ионами  $Zn^{2+}$  в активном центре HDAC I и II типа. Известен ряд ингибиторов HDAC с иными механизмами действия (например, короткоцепочечные жирные кислоты и производные бензамида) [76, 79, 80].

#### РОЛЬ KLF2 В КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ

В клетках эндотелия KLF2 участвует во многих регуляторных процессах. Действие KLF2 направлено на стимуляцию циркуляции крови, подавление агрегации тромбоцитов и способности клеток эндотелия к связыванию лимфоцитов и моноцитов. Активация KLF2 вызывает индукцию THBD, HO-1 и вазодилатационных генов eNOS и NPPC (предшественник натрийуретического пептида C). Вместе с тем KLF2 подавляет экспрессию таких сосудосуживающих факторов, как эндотелин 1 (ЕТ1) и ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ) [81]. Действие другой функциональной группы зависимых от KLF2 генов направлено на подавление коагуляции крови. KLF2 стимулирует экспрессию тромбомодулина, что далее способствует активации антитромботи-

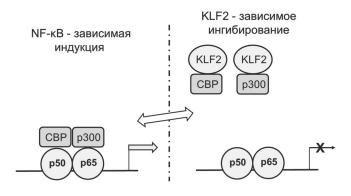
Влияние KLF2 на экспрессию генов в клетках иммунной системы и эндотелия

Т- и В-лимфоциты	Моноциты	Эндотелий	
	цитокины и хемокины	факторы адгезии	
↑ <i>L-селектин</i>	$\downarrow TNF\alpha$	↓ VCAM-1	
↑ <i>p21/Cip1</i>	↓ <i>IL-1β</i>	↓ ICAM-1	
↓ <i>CD154</i>	↓ MIP-1α	↓Е-селектин	
$\downarrow c$ -myc	↓ <i>MCP-1</i>		
v e mye	↓ <i>IL-8</i>		
		коагуляция и фибринолиз	
		↑ eNOS	
		↑ tPA	
		↑ тромбомодулин	
		↓ PAI-1	
		$\downarrow VWF$	
	про- и анти-воспалительные ферменты	тонус сосудов	
	↑ <i>HO-1</i>	↑ eNOS	
	↓ COX2	$\downarrow$ ACE	
de	<i>↓ COX2</i>	↓ ACE	

Обозначения: подавление ( $\downarrow$ ) и активация ( $\uparrow$ ) экспрессии генов.

ческого протеина С. Вместе с тем KLF2 ингибирует экспрессию протромботического фактора фон Виллебранда (VWF) и подавляющего фибринолиз ингибитора активации плазминогена 1 (PAI-1) [18]. Кроме того, KLF2 ослабляет протромботический эффект цитокинов, которые вызывают рост экспрессии PAI-1 и снижают уровень тромбомодулина. Также KLF2 подавляет базовую экспрессию и зависимую от IL-1β, IFNγ и липополисахаридов индукцию VCAM-1, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), Е-селектина и мембранной дифосфогидролазы ENTPD1 (CD39) (таблица). Как следствие, активация KLF2 ослабляет агрегацию Т-клеток и макрофагов с сосудистым эндотелием [18, 19, 70]. Ингибирующий эффект KLF2 на экспрессию генов, зависимых от про-воспалительных цитокинов, обусловлен подавлением фактора транскрипции NF-кВ [62, 82]. Тем самым контролирующая KLF2 сигнальная система ERK5/MEF2 и системы, контролирующие NF-кB, находятся в реципрокных отношениях. По-видимому, этот эффект основан на антагонизме между транскрипционными факторами MEF2 и NF-кВ. Оба фактора оказывают воздействие на ацетилирование белков транскрипционного комплекса. Ингибирующее действие NF-кВ на экспрессию KLF2 опосредовано привлечением HDAC4 и HDAC5 в промоторную область гена KLF2, действие MEF2 - конкуренцией с NF-кВ за образование комплекса с гистонацетилтрансферазами СВР и р300 (рис. 5 и 7) [18, 19, 83]. Молекулярный механизм конкуренции между KLF2 и NF-кВ за связывание с СВР/р300 остается неясным.

При ламинарном токе крови происходит погружение клеток эндотелия в состояние покоя, подавление их пролиферации и апоптоза. По-видимому, цитостатический эффект KLF2 обусловлен активацией экспрессии ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ р21/Сір1 [33]. Для морфологии эндотелия сосудов при высоких значениях напряжения сдвига характерно вытягивание клеток вдоль направления потока, что снижает механическую нагрузку на цитоскелет. В условиях турбулентности происходит морфологическая перестройка стенок кровеносных сосудов, эндотелиальные клетки не вытянуты в направлении потока, они могут принимать полигональную форму, в них повышены уровни пролиферации и апоптоза [30, 34, 35]. В этих условиях в эндотелиальных клетках возрастает активность NF-кВ и экспрессия адгезионных белков VCAM-1, ICAM-1 и Е-селектина, что способствует связыванию моноцитов. Для участков сосудов с турбулентным током крови характерен повышенный риск возникновения атеросклеротических повреждений [30, 34].



про-воспалительные гены

Рис. 7. Обобщенная схема участия КLF2 в подавлении транскрипции зависимых от NF-кВ про-воспалительных генов. Ингибирующее действие основано на конкуренции между KLF2 и субъединицами NF-кВ р50 и р65 за связывание с гистонацетилтрансферазами СВР и р300

### РОЛЬ KLF2 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Экспрессия KLF2 характерна для целого ряда клеток иммунной системы: моноцитов, Вклеток, Т-клеток CD4<sup>+</sup> (хелперы) и CD8<sup>+</sup> (киллеры) [18, 19, 83]. В В-клетках действие КLF2 направлено на подавление пролиферации, что опосредовано ростом экспрессии p21/Cip1 и снижением с-Мус [84]. В моноцитах, также как и в эндотелиальных клетках, про-воспалительные стимулы – IL-1β, TNFα и липополисахариды — подавляют экспрессию KLF2. В то же время KLF2 подавляет зависимую от липополисахаридов активацию моноцитов и экспрессию циклооксигеназы 2 (COX2), IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ , МІР-1α (макрофагальный белок воспаления 1β, macrophage inflammatory protein 1α) и MCP-1 [83, 85]. Уровень КLF2 в моноцитарных клетках снижается при их дифференцировке и превращении в макрофаги [82]. В Т-клетках при их активации также происходит быстрое снижение экспрессии KLF2, обусловленное, наряду со снижением транскрипции гена KLF2, убиквитинированием и ускоренной протеолитической деградацией. Эти процессы инициируются связыванием рецепторов TCR со своими лигандами. В Т-клетках с генотипом *KLF2*<sup>-/-</sup> происходит их спонтанная активация [86, 87]. Напротив, ослабляющий иммунные реакции фактор стабилизирует уровень KLF2 [88]. TGFβ Экспрессия KLF2 возрастает в зрелых T-клетках памяти. В процессе дифференцировки тимоцитов KLF2 стимулирует образование индуцированных регуляторных Т-клеток (iTreg) [88]. Тем самым действие KLF2 направлено на поддержа76 ТУРПАЕВ

ние Т-клеток в состоянии покоя и ослаблении клеточного иммунитета. Активация KLF2 такими фармакологическими препаратами, как, например, статины, подавляет аутоиммунные процессы. Статины снижают риск возникновения ревматоидного артрита. Они также облегчают течение ревматоидного артрита, множественного склероза и болезни Крона, но не влияют на ход системной красной волчанки и нейродегенеративных заболеваний. Вместе с тем можно ожидать, что статины ослабляют зависимую от иммунной системы элиминацию трансформированных клеток. Тем не менее такие опасения не подтверждаются статистическими исследованиями [89].

Из всего множества известных эффектов KLF2, по-видимому, более всего исследовано участие этого фактора в поддержании гомеостаза в сосудистом эндотелии, где KLF2 влияет на экспрессию широкого спектра генов. Через индукцию гена *eNOS* и последующий рост эндотелиальной генерации оксида азота KLF2 вовлечен в регуляцию циркуляции крови. Кроме того, действие KLF2 направлено на ослабление воспалительных процессов в эндотелии, подавление свертывания крови и агрегации тромбоцитов. Также KLF2 вовлечен в негативную регуляцию клеточного иммунитета, что проявляется в подавлении активации, дифференцировки и адгезии Т-лимфоцитов и моноцитов. Зависимое от KLF2 ослабление ответа клеток на про-воспалительные стимулы обусловлено подавлением транскрипционной активности NF-кВ. При этом факторы KLF2 и NF-кВ проявляют себя как взаимные антагонисты. В клетках активность KLF2 определяется уровнем его экспрессии, который в наибольшей степени зависит от фактора транскрипции MEF2. Активность MEF2 контролируют две сигнальные системы: одна, позитивная, включает протеинкиназу ERK5 и другая, негативная, включает гистондеацетилазы HDAC4 и HDAC5. Кроме того, экспрессия KLF2 зависит от значительного числа других сигнальных молекул и регуляторных систем: мембранных К+ каналов, сопряженных с тирозиновыми киназами механорецепторов, G-белков семейства Rho, ацетилтрансфераз СВР, р300 и РСАГ, транскрипционных факторов NF-кВ и FOXO1, лизиндеацетилазы SIRT1, Са<sup>2+</sup>-зависимых **AMPK** И протеинкиназ СаМККВ и СаМК [90, 91], а также некоторых эндокринных и паракринных факторов.

Представляется очевидным, что, будучи вовлеченным в столь большое число регуляторных процессов, KLF2 служит значимым объектом для фармакологических воздействий, направ-

ленных на ослабление воспалительных процессов и сопряженных с ними аутоиммунных заболеваний, таких как атеросклероз и нарушения липидного обмена. Также активация KLF2 должна способствовать подавлению ангиогенеза. Вместе с тем биологически активные соединения, которые могли бы подавлять экспрессию KLF2 в Т-лимфоцитах и моноцитах, могут способствовать усилению иммунных процессов. Известно большое число фармакологических препаратов и эндогенных сигнальных молекул, способных модулировать активность KLF2, что не является при этом их основным биологическим эффектом. Многие из таких препаратов воздействуют на целую группу родственных регуляторных белков или белков с близкими структурными доменами и влияют на широкий спектр клеточных процессов. Так, например, статины ингибируют все G-белки семейств Rho и Ras, а также и синтез стероидов, гидроксаматы ингибируют все HDAC I-го и II-го типа, метформин активирует АМРК и ингибирует митохондриальный NADH-дегидрогеназный комплекс, ресвератрол активирует лизиндеацетилазу SIRT1 и редокс-чувствительную Keap1/Nrf2. Все эти соединения оказывают множественное и не всегда благоприятное воздействие на протекающие в организме биохимические и физиологические процессы, что ограничивает возможности их применения. Подобное затруднение может быть преодолено при создании соединений, которые имели бы высокую избирательность в отношении именно тех регуляторных факторов, которые контролируют экспрессию KLF2, таких как, например, RhoA и HDAC4 и HDAC5. Также можно надеяться на дальнейшее исследование активации KLF2 под действием эндогенных сигнальных молекул, таких как эритропоэтин, ангиопоэтин, гуманин и оксид азота. В настоящее время это направление представлено только единичными работами [56, 70–72]. Также можно предположить, что впоследствии будут разработаны биологически активные олигопептидные аналоги эритропоэтина и гуманина, высокоизбирательные в отношении контролирующих KLF2 сигнальных систем.

**Финансирование.** Работа была выполнена в рамках Государственного задания № АААА-A18-118012390247-0.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет 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. Miller, I.J., and Bieker, J.J. (1993) A novel, erythroid cellspecific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins, Mol. Cell. Biol., 13, 2776-2786.
- 2. Pei, J., and Grishin N.V. (2015) C2H2 zinc finger proteins of the SP/KLF, Wilms tumor, EGR, Huckebein, and Klumpfuss families in metazoans and beyond, Gene, 573, 91–99.
- 3. Pollak, N.M., Hoffman, M., Goldberg, I.J., and Drosatos, K. (2018) Krüppel-like factors: crippling and un-crippling metabolic pathways, *JACC Basic Transl. Sci.*, **3**, 132–156.
- Lomberk, G., and Urrutia, R. (2005) The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins, Biochem. J., 392, 1–11.
- Stubbs, L., Sun, Y., and Caetano-Anolles, D. (2011) Function and evolution of C2H2 zinc finger arrays, Subcell. Biochem., **52**, 75–94. Bialkowska, A.B., Yang, V.W., and Mallipattu, S.K. (2017)
- Krüppel-like factors in mammalian stem cells and development, *Development*, **144**, 737–754. Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M., and
- Bao, S. (2008) Krüppel-like transcription factors: a functional family, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 1996–2001. Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R. (2003) Sp1- and
- Krüppel-like transcription factors, Genome Biol., 4, 206.
- Wu, Z., and Wang, S. (2013) Role of Krüppel-like transcription factors in adipogenesis, *Dev. Biol.*, **373**, 235–243.
- Zhang, P., Basu, P., Redmond, L.C., Morris, P.E., Rupon, J.W., Ginder, G.D., and Lloyd, J.A. (2005) A functional screen for Krüppel-like factors that regulate the human gammaglobin gene through the CACCC promoter element, Blood
- Cells Mol. Dis., 35, 227–235.

  Huang, B., Ahn, Y.T., McPherson, L., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (2007) Interaction of PRP4 with Kruppellike factor 13 regulates CCL5 transcription, J. Immunol., **178**, 7081–7087.
- Kaczynski, J.A., Conley, A.A., Fernandez Zapico, M., Delgado, S.M., Zhang, J.S., and Urrutia, R. (2002) Functional analysis of basic transcription element (BTE)binding protein (BTEB) 3 and BTEB4, a novel Sp1-like protein, reveals a subfamily of transcriptional repressors for the BTE site of the cytochrome P4501A1 gene promoter, Biochem. J., 366, 873-882.
- 13. Mas, C., Lussier-Price, M., Soni, S., Morse, T., Arseneault, G., Di Lello, P., Lafrance-Vanasse, J., Bieker, J.J., and Omichinski, J.G. (2011) Structural and functional characterization of an atypical activation domain in erythroid Kruppel-like factor (EKLF), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 10484-10489.
- Presnell, J.S., Schnitzler, C.E., and Browne, W.E. (2015) KLF/SP Transcription factor family evolution: expansion, diversification, and innovation in eukaryotes, Genome Biol. Evol., 7, 2289-2309.
- Schmitz, M.L., and de la Vega, L. (2015) New insight into the role of histone deacetylases as coactivators of inflamma-
- tory gene expression, *Antioxid. Redox Signal.*, **23**, 85–98. Wagner, T., Brand, P., Heinzel, T., and Krämer, O.H. (2014) Histone deacetylase 2 controls p53 and is a critical factor in tumorigenesis, Biochim. Biophys. Acta, 1846, 524-538.
- Anderson, K.P., Kern, C.B., Crable, S.C., and Lingrel, J.B. (1995) Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family, Mol. Cell. Biol., 15, 5957-5965.
- Novodvorsky, P., and Chico, T.J. (2014) The role of the transcription factor KLF2 in vascular development and disease, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 124, 155-188.
- Jha, P., and Das, H. (2017) KLF2 in regulation of NF-κBmediated immune cell function and inflammation, Int. J. Mol. Sci., 18, E2383.

- Ghaleb, A.M., and Yang, V.W. (2017) Krüppel-like factor 4 (KLF4): what we currently know, Gene, 611, 27-37.
- Chestkov, I.V., Khomyakova, E.A., Vasilieva, E.A., Lagarkova, M.A., and Kiselev, S.L. (2014) Molecular barriers to processes of genetic reprogramming and cell transformation, Biochemistry (Moscow), 79, 1297–1307.
- 22. Kunes, P., Holubcová, Z., and Krejsek, J. (2009) Occurrence and significance of the nuclear transcription factor Krüppel-like factor 4 (KLF4) in the vessel wall, Acta Medica (Hradec Kralove), 52, 135–139.
- Villarreal, G. Jr., Zhang, Y., Larman, H.B., Gracia-Sancho, J., Koo, A., and García-Cardeña, G. (2010) Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 391, 984-989.
- Zhao, Y., and Sun, Y. (2013) The FBW7-KLF2 axis regulates endothelial functions, Cell Res., 23, 741–743.
- Zhang, X., Srinivasan, S.V., and Lingrel, J.B. (2004) WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Krüppel-like factor, KLF2, Biochem. Biophys. Res. Commun., 316, 139–148. Sohn, S.J., Li, D., Lee, L.K., and Winoto, A. (2005) Transcrip-
- tional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogenactivated protein kinase, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 8553–8566. Chen, X., Gao, B., Ponnusamy, M., Lin, Z., and Liu, J.
- (2017) MEF2 signaling and human diseases, Oncotarget, 8, 112152-112165.
- Roberts, O.L., Holmes, K., Müller, J., Cross, D.A., and Cross, M.J. (2009) ERK5 and the regulation of endothelial cell function, Biochem. Soc. Trans., 37, 1254-1259.
- Drew, B.A., Burow, M.E., and Beckman, B.S. (2012) MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years, *Biochim*. Biophys. Acta, 1825, 37-48.
- Nakajima, H., and Mochizuki, N. (2017) Flow patterndependent endothelial cell responses through transcriptional regulation, Cell Cycle, 16, 1893–1901.
- Nigro, P., Abe, J., and Berk, B.C. (2011) Flow shear stress and atherosclerosis: a matter of site specificity, Antioxid. Redox Signal., 15, 1405-1414.
- Simmons, R.D., Kumar, S., and Jo, H. (2016) The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches, Arch. Biochem. Biophys., 591, 111–131.
- Lu, L., Huang, W., Hu, W., Jiang, L., Li, Y., Wu, X., Yuan, D., and Li, M. (2019) Kruppel-like factor 2 mediated anti-proliferative and anti-metastasis effects of simvastatin in p53 mutant colon cancer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 511, 772-779.
- Heo, K.S., Berk, B.C., and Abe, J. (2016) Disturbed flowinduced endothelial proatherogenic signaling via regulating post-translational modifications and epigenetic events, Antioxid. Redox Signal., 25, 435-450.
- 35. Ballermann, B.J., Dardik, A., Eng, E., and Liu, A. (1998) Shear stress and the endothelium, *Kidney Int. Suppl.*, **67**, \$100–108.
- Givens, C., and Tzima, E. (2016) Endothelial mechanosignaling: does one sensor fit all? Antioxid. Redox Signal., 25, 373-388.
- 37. Liu, H.B., Zhang, J., Xin, S.Y., Liu, C., Wang, C.Y., Zhao, D., and Zhang, Z.R. (2013) Mechanosensitive properties in the endothelium and their roles in the regulation of endothelial function, J. Cardiovasc. Pharmacol., 61, 461–470.
- Ando, J., and Yamamoto, K. (2013) Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells, Cardiovasc. Res., 99, 260–268.
- Snyder, J.L., McBeath, E., Thomas, T.N., Chiu, Y.J., Clark, R.L., and Fujiwara, K. (2017) Mechanotransduction properties of the cytoplasmic tail of PECAM-1, Biol. Cell, **109**, 312–321.
- Conway, D.E., Coon, B.G., Budatha, M., Arsenovic, P.T., Orsenigo, F., Wessel, F., Zhang, J., Zhuang, Z., Dejana, E.,

78 ТУРПАЕВ

Vestweber, D., and Schwartz, M.A. (2017) VE-cadherin phosphorylation regulates endothelial fluid shear stress responses through the polarity protein LGN, *Curr. Biol.*, **27**, 2219–2225.

- 41. Kwon, I.S., Wang, W., Xu, S., and Jin, Z.G. (2014) Histone deacetylase 5 interacts with Krüppel-like factor 2 and inhibits its transcriptional activity in endothelium, *Cardiovasc. Res.*, **104**, 127–137.
- 42. McSweeney, S.R., Warabi, E., and Siow, R.C. (2016) Nrf2 as an endothelial mechanosensitive transcription factor: going with the flow, *Hypertension*, **67**, 20–29.
- 43. Takabe, W., Warabi, E., and Noguchi, N. (2011) Antiatherogenic effect of laminar shear stress via Nrf2 activation, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1415–1426.
- 44. Turpaev, K.T. (2013) Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 111–126.
- Wardyn, J.D., Ponsford, A.H., and Sanderson, C.M. (2015)
   Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways, *Biochem. Soc. Trans.*, 43, 621–626.
- Kumar, A., Lin, Z., SenBanerjee, S., and Jain, M.K. (2005) Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases, Mol. Cell. Biol., 25, 5893-5903.
- histone deacetylases, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5893–5903.

  47. Lee, H.Y., Youn, S.W., Cho, H.J., Kwon, Y.W., Lee, S.W., Kim, S.J., Park, Y.B., Oh, B.H., and Kim, H.S. (2013) FOXO1 impairs whereas statin protects endothelial function in diabetes through reciprocal regulation of Kruppellike factor 2, *Cardiovasc. Res.*, **97**, 143–152.
- 48. Kumar, A., Kim, C.S., Hoffman, T.A., Naqvi, A., Dericco, J., Jung, S.B., Lin, Z., Jain, M.K., and Irani, K. (2011) p53 Impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-like factor 2, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31, 133–141.
- Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Wang, K.C., Geary, G.G., Zhang, Y., Wang, W.C., Huang, H.D., Zhou, J., Li, Y.S., Chien, S., Garcia-Cardena, G., and Shyy, J.Y. (2011) Flow-dependent regulation of Kruppellike factor 2 is mediated by microRNA-92a, *Circulation*, 124, 633-641.
- 50. Xin, Y., Zhang, H., Jia, Z., Ding, X., Sun, Y., Wang, Q., and Xu, T. (2018) Resveratrol improves uric acid-induced pancreatic β-cells injury and dysfunction through regulation of miR-126, *Biomed. Pharmacother.*, **102**, 1120–1126.
- Manoharan, P., Basford, J.E., Pilcher-Roberts, R., Neumann, J., Hui, D.Y., and Lingrel, J.B. (2014) Reduced levels of microRNAs miR-124a and miR-150 are associated with increased proinflammatory mediator expression in Krüppel-like factor 2 (KLF2)-deficient macrophages, *J. Biol. Chem.*, 289, 31638–31646.
- 52. Marin, T., Gongol, B., Chen, Z., Woo, B., Subramaniam, S., Chien, S., and Shyy, J.Y. (2013) Mechanosensitive microRNAs-role in endothelial responses to shear stress and redox state, *Free Radic. Biol. Med.*, **64**, 61–68.
- Chu, U.B., Duellman, T., Weaver, S.J., Tao, Y., and Yang, J. (2015) Endothelial protective genes induced by statin are mimicked by ERK5 activation as triggered by a drug combination of FTI-277 and GGTI-298, *Biochim. Biophys. Acta*, 1850, 1415–1425.
- Zhao, J., Natarajan, S.K., Chronos, N., and Singh, J.P. (2015) Cerivastatin represses atherogenic gene expression through the induction of KLF2 via isoprenoid metabolic pathways, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 20, 825–839.
- Jeong, A., Suazo, K.F., Wood, W.G., Distefano, M.D., and Li, L. (2018) Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 53, 279–310.
- Turpaev, K., Glatigny, A., Bignon, J., Delacroix, H., and Drapier, J.C. (2010) Variation in gene expression profiles of

- human monocytic U937 cells exposed to various fluxes of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 298–305.
- 57. Xu, Q., Luan, T., Fu, S., Yang, J., Jiang, C., and Xia, F. (2014) Effects of pitavastatin on the expression of VCAM-1 and its target gene miR-126 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Ther.* 32, 193–197
- vein endothelial cells, *Cardiovasc. Ther.*, **32**, 193–197.

  58. Arefieva, T.I., Filatova, A.Y., Potekhina, A.V., and Shchinova, A.M. (2018) Immunotropic effects and proposed mechanism of action for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 874–889.
- Davies, J.T., Delfino, S.F., Feinberg, C.E., Johnson, M.F., Nappi, V.L., Olinger, J.T., Schwab, A.P., and Swanson, H.I. (2016) Current and emerging uses of statins in clinical therapeutics: a review, *Lipid Insights*, 9, 13–29.
- 60. Ebert, R., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Klotz, B., Rachner, T.D., Benad, P., Klein-Hitpass, L., Rudert, M., Hofbauer, L.C., and Jakob, F. (2012) Krüppel-like factors KLF2 and 6 and Ki-67 are direct targets of zoledronic acid in MCF-7 cells, *Bone*, **50**, 723–732.
- 61. Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., and Mönkkönen, J. (2011) Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates, *Bone*, **49**, 34–41.
- Chu, H., Li, H., Guan, X., Yan, H., Zhang, X., Cui, X., Li, X., and Cheng, M. (2018) Resveratrol protects late endothelial progenitor cells from TNF-α-induced inflammatory damage by upregulating Krüppel-like factor-2, *Mol. Med. Rep.*, 17, 5708–5715.
- Bai, X., Yao, L., Ma, X., and Xu, X. (2018) Small molecules as SIRT modulators, *Mini Rev. Med. Chem.*, 18, 1151–1157.
- 64. Santos, J.C., Gotardo, E.M., Brianti, M.T., Piraee, M., Gambero, A., and Ribeiro, M.L. (2014) Effects of yerba maté, a plant extract formulation ("YGD") and resveratrol in 3T3-L1 adipogenesis, *Molecules*, **19**, 16909–16924.
- 65. Xu, Y., Liu, P., Xu, S., Koroleva, M., Zhang, S., Si, S., and Jin, Z.G. (2017) Tannic acid as a plant-derived polyphenol exerts vasoprotection via enhancing KLF2 expression in endothelial cells, *Sci. Rep.*, 27, 6686.
- Arçari, D.P., Santos, J.C., Gambero, A., and Ribeiro, M.L. (2013) The *in vitro* and *in vivo* effects of yerba mate (Ilex paraguariensis) extract on adipogenesis, *Food Chem.*, 141, 809–815.
- 67. Jeon, H.J., Choi, H.S., Lee, Y.J., Hwang, J.H., Lee, O.H., Seo, M.J., Kim, K.J., and Lee, B.Y. (2015) Seapolynol extracted from Ecklonia cava inhibits adipocyte differentiation *in vitro* and decreases fat accumulation *in vivo*, *Molecules*, **20**, 21715–21731.
- Lee, J.E., and Ge, K. (2014) Transcriptional and epigenetic regulation of PPARgamma expression during adipogenesis, *Cell Biosci.*, 4, 29.
- Kim, S.J., Xiao, J., Wan, J., Cohen, P., and Yen, K. (2017) Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism, *J. Physiol.*, 595, 6613–6621.
- Wang, X., Wu, Z., He, Y., Zhang, H., Tian, L., Zheng, C., Shang, T., Zhu, Q., Li, D., and He, Y. (2018) Humanin prevents high glucose-induced monocyte adhesion to endothelial cells by targeting KLF2, *Mol. Immunol.*, 101, 245–250.
- 71. Wang, D., Song, Y., Zhang, J., Pang, W., Wang, X., Zhu, Y., and Li, X. (2017) AMPK-KLF2 signaling pathway mediates the proangiogenic effect of erythropoietin in endothelial colony-forming cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **313**, C674–C685.
- Sako, K., Fukuhara, S., Minami, T., Hamakubo, T., Song, H., Kodama, T., Fukamizu, A., Gutkind, J.S., Koh, G.Y., and Mochizuki, N. (2009) Angiopoietin-1 induces Kruppellike factor 2 expression through a phosphoinositide 3kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2, *J. Biol. Chem.*, 284, 5592–5601.

- 73. Турпаев К.Т. (2017) *Гены и регуляторные системы клеток, зависимые от NO и модификации рецепторных тиольных групп*, Автореф. дисс. докт. наук, Институт молекулярной биологии РАН, Москва.
- Tian, R., Li, R., Liu, Y., Liu, J., Pan, T., Zhang, R., Liu, B., Chen, E., Tang, Y., and Qu, H. (2019) Metformin ameliorates endotoxemia-induced endothelial pro-inflammatory responses via AMPK-dependent mediation of HDAC5 and KLF2, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 1865, 1701–1712.
- Triggle, C.R., and Ding, H. (2016) Metformin is not just an antihyperglycaemic drug but also has protective effects on the vascular endothelium, *Acta Physiol. (Oxf.)*, 219, 138–151.
- Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2017) Treatment of cardiovascular pathology with epigenetically active agents: focus on natural and synthetic inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation, *Int. J. Cardiol.*, 227, 66–82.
- 77. Xu, Y., Xu, S., Liu, P., Koroleva, M., Zhang, S., Si, S., and Jin, Z.G. (2017) Suberanilohydroxamic acid as a pharmacological Kruppel-like factor 2 activator that represses vascular inflammation and atherosclerosis, *J. Am. Heart Assoc.*, 6, e007134.
- Das, M., Laha, D., Kanji, S., Joseph, M., Aggarwal, R., Iwenofu, O.H., Pompili, V.J., Jain, M.K., and Das, H. (2019) Induction of Krüppel-like factor 2 reduces K/BxN serum-induced arthritis, J. Cell. Mol. Med., 23, 1386–1395.
- Hadden, M.J., and Advani, A. (2018) Histone deacetylase inhibitors and diabetic kidney disease, *Int. J. Mol. Sci.*, 19, E2630
- 80. Yoon, S., and Eom, G.H. (2016) HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases, *Chonnam. Med. J.*, **52**, 1–11.
- 81. Dekker, R.J., van Thienen, J.V., Rohlena, J., de Jager, S.C., Elderkamp, Y.W., Seppen, J., de Vries, C.J., Biessen, E.A., van Berkel, T.J., Pannekoek, H., and Horrevoets, A.J. (2005) Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes, *Am. J. Pathol.*, **167**, 609–618.

- 82. Das, M., Lu, J., Joseph, M., Aggarwal, R., Kanji, S., McMichael, B.K., Lee, B.S., Agarwal, S., Ray-Chaudhury, A., Iwenofu, O.H., Kuppusamy, P., Pompili, V.J., Jain, M.K., and Das, H. (2012) Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates monocyte differentiation and functions in mBSA and IL-1β-induced arthritis, *Curr. Mol. Med.*, 12, 113–125.
- 83. Zhong, F., Lee, K., and He, J.C. (2018) Role of Krüppellike factor-2 in kidney disease, *Nephrology (Carlton)*, **23**, Suppl. 4, 53–56.
- Winkelmann, R., Sandrock, L., Kirberg, J., Jäck, H.M., and Schuh, W. (2014) KLF2 – a negative regulator of pre-B cell clonal expansion and B cell activation, *PLoS One*, 29, e97953.
- Nayak, L., Goduni, L., Takami, Y., Sharma, N., Kapil, P., Jain, M.K., and Mahabeleshwar, G.H. (2013) Kruppellike factor 2 is a transcriptional regulator of chronic and acute inflammation, *Am. J. Pathol.*, 182, 1696–1704.
   Pabbisetty, S.K., Rabacal, W., Volanakis, E.J., Parekh, V.V.,
- Pabbisetty, S.K., Rabacal, W., Volanakis, E.J., Parekh, V.V., Olivares-Villagómez, D., Cendron, D., Boyd, K.L., Van Kaer, L., and Sebzda, E. (2016) Peripheral tolerance can be modified by altering KLF2-regulated Treg migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, E4662–E4670.
- 87. Li, M., Wang, X., Fu, W., He, S., Li, D., and Ke, Q. (2011) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells protect endothelial function impaired by oxidized low density lipoprotein via the KLF-2 transcription factor, *Cell. Physiol. Biochem.*, **28**, 639–648.
- 88. Pabbisetty, S.K., Rabacal, W., Maseda, D., Cendron, D., Collins, P.L., Hoek, K.L., Parekh, V.V., Aune, T.M., and Sebzda, E. (2014) KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9579–9584.
- 89. Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A., and Bifulco, M. (2014) Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer, *Pharmacol. Res.*, **88**, 84–98.
- Fullerton, M.D. (2016) AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.*, 27, 172–80.
- 91. Marcelo, K.L., Means, A.R., and York, B, (2016) The Ca(2+)/calmodulin/CaMKK2 axis: nature's metabolic CaMshaft, *Trends Endocrinol. Metab.*, 27, 706–718.

## TRANSCRIPTION FACTOR KLF2 AND ITS ROLE IN THE REGULATION OF INFLAMMATORY PROCESSES

#### **Review**

#### K. T. Turpaev

Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kyril.turpaev@yahoo.com

Received May 11, 2019 Revised August 2, 2019 Accepted October 7, 2019

KLF2 is a member of the Krüppel-like transcription factor family of proteins containing highly conserved DNA-binding zinc finger domains. KLF2 participates in the differentiation and regulation of the functional activity of monocytes, T lymphocytes, adipocytes, and vascular endothelial cells. The activity of KLF2 is controlled by several regulatory systems, including the MEKK2,3/MEK5/ERK5/MEF2 MAP kinase cascade, Rho family G-proteins, histone acetyltransferases CBP and p300, and histone deacetylases HDAC4 and HDAC5. Activation of KLF2 in endothelial cells induces eNOS expression and provides vasodilatory effect. Many KLF2-dependent genes participate in the suppression of blood coagulation and aggregation of T cells and macrophages with the vascular endothelium, thereby preventing atherosclerosis progression. KLF2 can have a dual effect on the gene transcription. Thus, it induces expression of multiple genes but suppresses transcription of NF- $\kappa$ B-dependent genes. Transcription factors KLF2 and NF- $\kappa$ B are reciprocal antagonists. KLF2 inhibits induction of NF- $\kappa$ B-dependent genes, whereas NF- $\kappa$ B downregulates KLF2 expression. KLF2-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B signaling leads to the suppression of cell response to the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF and results in the attenuation of inflammatory processes.

Keywords: KLF2, zinc fingers, regulation of transcription, pro-inflammatory cytokines, endothelium

УДК 577.1, 57.088

# МЕТОДЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ИНТЕРАКТОМИКИ В ВОПРОСАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОФОРМ ЧЕЛОВЕКА

#### Обзор

© 2020 Е.В. Поверенная\*, О.И. Киселева, А.С. Иванов, Е.А. Пономаренко

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия; электронная почта: k.poverennaya@gmail.com

Поступила в редакцию 25.03.2019 После доработки 16.09.2019 Принята к публикации 07.10.2019

Для человека известно около 20 000 белок-кодирующих генов, которые могут быть транслированы в миллионы уникальных видов белков (протеоформ). Протеоформы, кодируемые одним геном, зачастую отличаются по функции, что соответствует различиям в белковых партнерах. Взаимодействуя между собой, протеоформы образуют сеть, отражающую динамически изменяющиеся клеточные процессы в организме. Нарушение белок-белковых взаимодействий (ББВ) вызывает изменение в топологии сети, что зачастую приводит к возникновению патологических процессов. Изучение протеоформ — это относительно новая задача в протеомике, а потому экспериментальных работ по взаимодействию протеоформ немного. Биоинформатические инструменты позволяют решать ряд задач, комплементарно дополняя и обогащая экспериментальные результаты, в частности, расширяя возможности в исследовании взаимодействия протеоформ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белок-белковые взаимодействия, интерактомика, биоинформатика.

DOI: 10.31857/S0320972520010066

Функционирование живой клетки осуществляется за счет множества различных молекулярных взаимодействий между белками, нуклеиновыми кислотами, пептидами, метаболитами и т.д. Несмотря на то что понятие «интерактом» комплексное, объединяющее все виды взаимодействий, наиболее часто его употребляют в отношении белок-белковых взаимодействий (ББВ). Именно белковые взаимодействия играют ключевую роль в биологических процессах [1].

Под взаимодействием белков подразумевается связь двух и более белковых молекул, обеспечивающая выполнение биологической функции. Различают физические взаимодействия и взаимодействия в составе сети [2]. Физические взаимодействия подразделяются на прямые (бинарные) и комплексные. Группа белков, которые взаимодействуют друг с другом одновременно, называется белковым комплексом.

Существуют различные экспериментальные методы выявления белок-белковых взаимодействий [3]. Основными являются двугибридная

Принятые сокращения: AP-MS — аффинное выделение белкового комплекса с последующим масс-спектрометрическим анализом, ББВ — белок-белковые взаимодействия, Y2H — двугибридная дрожжевая система, ПТМ — посттрансляционные модификации.

дрожжевая система (yeast two-hybrid, Y2H) [4] и аффинное выделение белкового комплекса с последующим масс-спектрометрическим анализом (affinity purification—mass spectrometry, AP-MS) [5].

Технология Y2H основана на активации экспрессии репортерных генов, которая возникает в результате взаимодействия между целевым белком-«наживкой» и его партнером белком-«добычей» и может быть детектирована.

За 25 лет с момента изобретения первого варианта метода Y2H [6] было разработано множество альтернативных протоколов, позволяющих, например, использовать помимо дрожжей клетки других организмов [7], а также исследовать взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами: ДНК (one-hybrid, 1H, [8]) и РНК (three-hybrid, 3H, [9]). Преимуществом метода Y2H является простота и возможность автоматизации анализа, что позволяет масштабировать эксперименты.

Метод AP-MS состоит в «вылавливании» белков-партнеров на иммобилизованный белок-«наживку» с последующим протеолизом и масс-спектрометрическим анализом пептидных фрагментов образовавшихся комплексов, смываемых с колонки [10, 11]. Масс-спектрометрическая часть метода позволяет «регистрировать»

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.

динамично изменяющиеся белковые комплексы, учитывая посттрансляционные модификации (ПТМ), которые могут обладать биологической функцией. Следует также отметить гибкость метода AP-MS. Она выражается в возможности использования нативных антител к эндогенным «наживкам» или в использовании эпитопных меток, что в первом случае позволяет проводить очистку белков в естественной среде клеточного лизата и учитывать взаимодействия сразу нескольких природных форм белка, а во втором - позволяет проводить эксперимент даже в отсутствие природного антитела [3]. Существует несколько десятков модификаций метода, касающихся не только способа «вылавливания» целевого белка, но и вариантов пробоподготовки и очистки белкового комплекса [5].

Оба метода не лишены недостатков, основной из которых — высокая доля ложных результатов: ложноположительных, при которых реального взаимодействия между белками нет, и ложноотрицательных, при которых существующие ББВ не детектируются. Методы Ү2Н, сфокусированные на выявлении бинарных белковых взаимодействий, характеризуются высокой долей ложных идентификаций в силу ряда причин (например, неестественно высокой концентрации фьюжн-белков в тестовой системе и неспецифичности аффинных реагентов) [12]. Для методов, основанных на AP-MS, ложноположительные результаты встречаются значительно реже, однако при экстракции и «отмывке» белковых комплексов утрачивается часть взаимодействий. Суммарно доля взаимодействий, установленных методом Y2H, достигает 20%, а методом AP-MS -55% [11].

С физической точки зрения взаимодействие белков характеризуется константой диссоциации. Для определения кинетики физического взаимодействия белков в большинстве случаев используют оптические биосенсоры [13]. Однако число белковых пар, для которых возможно измерить константы диссоциации, весьма ограничено в силу сложности получения чистых белков в достаточном количестве для проведения экспериментальных работ.

Накопление большого массива интерактомных данных, полученных опытным путем, и их противоречивость, а также изначальная сложность объектов исследования привели к активному развитию биоинформатических методов. В первую очередь методы *in silico* используются для предсказания и описания новых ББВ на основе ранее полученных сведений [14]. Предсказательные алгоритмы базируются на анализе геномных данных, аминокислотных последовательностей, данных о трехмерных структурах

белков и результатах транскриптомных и протеомных экспериментов. Отдельной задачей биониформатики является верификация сведений о ББВ, заключающаяся в определении взаимодействий в результатах, полученных масс-спектрометрически [15]. Основываясь на предположении, что физически взаимодействующие белки функционально связаны между собой, вычислительные подходы используются также для предсказания функций белков [16].

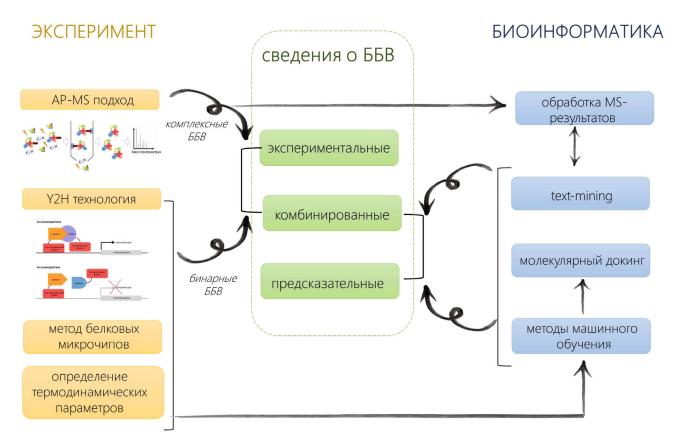
Кроме того, построение и анализ интерактомных сетей возможны только с помощью вычислительных инструментов, учитывающих комплексность данных, обработка которых требует недостижимых человеку когнитивных способностей. Интеграция экспериментальных и биоинформатических методов, направленная на детальное изучение аспектов взаимодействия белков и их форм в клетке, представляет собой современную интерактомику (рисунок).

#### ИНТЕРАКТОМ ЧЕЛОВЕКА

По объему накопленных сведений человек является наиболее изученным организмом, согласно протеомному ресурсу UniProtKB (www. uniprot.org) [17]. Более 90% белок-кодирующих генов человека были подтверждены на протеомном уровне, при этом сведения о ББВ имеются для 93%. Примечательно, что в ряде случаев наличие данных о ББВ является доказательством существования белка.

Доказательство трансляции белка является критичным условием для достоверности белокбелковых взаимодействий. В большинстве предсказательных методов данной информацией пренебрегают, предполагая, что если взаимодействие возможно, то оно имеет место быть, а текущие ограничения связаны с недостаточной чувствительностью аналитических методов [18].

Немаловажным аспектом является описание конкретного типа белковой молекулы — протеоформы, которая может быть образована в результате альтернативного сплайсинга, несинонимичных замен отдельных нуклеотидов, различных ПТМ и ряда других более редких событий [19]. Суммарное количество протеоформ в организме человека окончательно не выяснено: в зависимости от используемого прогноза, учитывающего возможность одновременного возникновения нескольких аберраций в белковом продукте одного гена, снизу оно ограничено миллионами уникальных белковых молекул, а сверху — может достигать астрономических величин [20, 21].



Основные методы экспериментальной и вычислительной интерактомики

Важность учета индивидуальных протеоформ заключается в том, что наличие модификаций и изменений аминокислотного состава белка зачастую критично для выполняемых им функций, и профили белок-белковых взаимодействий для протеоформ, кодируемых одним геном, могут отличаться [22, 23].

Аберрации, приводящие к возникновению протеоформ и изменению их посттрансляционного статуса, связывают с развитием не только онкологических [24], но и других социальнозначимых заболеваний [20]: в их числе аутоиммунные [25], метаболические [26] и нейродегенеративные [27] патологии.

Расшифровка протеома, реализуемая в рамках международного проекта «Протеом человека» [28], дала исследователям набор различных методов по выявлению протеоформ [29]. В связи с этим в последние годы появились работы по выявлению белковых взаимодействий для различного типа протеоформ [22, 30, 31]. В большинстве случаев предсказание ББВ для протеоформ осуществляется на основе изменений канонической структуры белка либо же выявлены экспериментальным путем в результате AP-MS экспериментов. Несмотря на развитие тенденции перехода от гено-центричного к протеоформ-центричному интерактому, доминирование сведений о ББВ для гена сохраняется.

В 2006 году было проведено исследование интерактома человека, в котором было определено, что среди полученного количества ББВ (154 000-369 000) большая часть представлена ложноположительными данными и только 10% белковых взаимосвязей являются «истинными» [32]. В 2008 году количество ББВ человека было оценено уже в 650 000 [33]. На текущий момент это самая большая оценка существующего интерактома, однако есть мнения, что данная величина выше реально существующей в гено-центричном контексте [34, 35]. Тем не менее количество выявленных бинарных ББВ увеличивается с каждым годом [34]. В рамках 4-х крупнейших проектов [36-38] по созданию интерактомных карт человека было выявлено >15 000 бинарных взаимодействий, полученных разными экспериментальными методами. Суммарно было выявлено >90 000 ББВ, однако только 10% встречались более чем в одном проекте [39].

Противоречивость данных может быть как результатом технической ошибки, разной чувствительности аналитических методов, так и

наблюдаемыми эффектами биологической вариабельности, обусловленной анализом различных типов биоматериалов, динамичностью и гетерогенностью протеома. Решение данной дилеммы возможно с помощью методов биоинформатики, которая позволяет как предсказывать ББВ для дальнейшей проверки, так и верифицировать получаемые экспериментальные данные для получения новых предсказаний.

#### МЕТОДЫ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ (ММО)

Развитие постгеномных технологий привело к накоплению данных в области протеомики, геномики и транскриптомики. В связи с этим актуальными становятся биоинформатические методы анализа данных, которые позволяют повысить уровень достоверности интерактома и выявить новые закономерности взаимодействий между белками [40].

Существенную группу среди применяемых алгоритмов поиска ББВ представляют методы машинного обучения. Алгоритмы машинного обучения, к которым относятся метод опорных векторов (support vector machine — SVM), Байесовские сети (Bayesian network), деревья принятия решения (decision tree), цепи Маркова (Markov chain) и др., позволяют оценить вероятность взаимодействия между белками по набору их признаков [41]. Обязательным условием работы таких алгоритмов является наличие обучающей выборки, на основе которой настраивают параметры работы методов.

Метод опорных векторов весьма популярен при исследовании интерактома [2]. Суть подхода заключается в минимизации рисков ложных идентификаций путем поиска гиперплоскости, которая наилучшим образом разделяет два класса объектов (взаимодействующие и невзаимодействующие белки) по набору переменных [42].

Другой подход — использование Байесовских сетей для предсказания ББВ [43]. Байесовские сети позволяют использовать данные различного типа (к примеру, описательные и числовые характеристики), выражая их в виде условных вероятностей. При этом можно компенсировать отсутствие каких-либо признаков у объектов, а также учитывать вес каждого признака в соответствии с его надежностью [44]. Вероятность взаимодействия двух белков рассчитывается как вероятность наблюдения определенного набора признаков для двух белков при условии, что они являются взаимодействующими. Преимущества использования данного метода были показаны в

работе Scott и Barton [45], где уровень ошибки был снижен на то время с 90 до 76%.

Деревья принятия решения используются как один из методов для предсказания ББВ, а также для подтверждения взаимодействий, поэкспериментальными лученных методами. Каждое дерево состоит из узлов — атрибутов, характеризующих некое свойство белка, ребер – «веток» дерева, на которых записаны значения атрибутов, и «листьев», которым приписаны значения целевой функции, т.е. взаимодействуют белки или нет [2]. Для классификации нового случая необходимо создать такое дерево на основе обучающей выборки, а затем «пройти от корня к листьям» для предсказания взаимодействия между белками.

В методе «случайного леса» (random forest) используется множество таких «деревьев». Итоговое решение принимается путем консенсусного голосования для совокупности всех «деревьев». В интерактомике человека метод «случайного леса» получил большую популярность по сравнению с методом дерева принятия решения [46].

Методы машинного обучения широко используются для разных подходов выявления ББВ: на основе аминокислотной/нуклеотидной последовательности [47], структурной информации [31], филогенетических данных [48], профилей экспрессии [49], анализа интерактомных сетей и т.д. [50]. Кроме того, они получили широкое использование в обработке экспериментальных данных [38] и при интеграции различных типов данных [51]. Модификации и вариации методов различны, в некоторых случаях используются сразу несколько подходов [52].

#### ПРЕДСКАЗАНИЕ БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНОЙ ИНФОРМАЦИИ

Возрастающее внимание к изучению протеоформ способствовало открытию «второго дыхания» у методов выявления белковых взаимодействий на основе структурной информации. Данные методы основаны на наблюдении, что белки, имеющие сходную третичную структуру или консервативные участки последовательности, обладают и сходной функцией в клетке, а значит могут взаимодействовать с одинаковыми партнерами [53, 54].

Десятилетия применения рентгеновской кристаллографии позволили получить данные о структуре белковых комплексов. Эти сведения являются богатым источником для изучения принципов взаимодействий белков. На настоящий момент в PDB (Protein Data Bank) [55]

опубликовано >40 000 3D-структур белков человека и их комплексов, и использование принципа гомологии белковых последовательностей позволяет существенно расширить этот набор. В 2002 году Aloy и Russel [56] использовали данные о трехмерной структуре гомологичных белков, чтобы оценить вероятность взаимодействия предлагаемых пар. Учитывая известные 3D-структуры белковых комплексов и гомологичные последовательности для каждого взаимодействующего белка, подходы, основанные на аналогах трехмерных структур, позволяют оценить вероятность возможных взаимодействий между гомологами одного и того же вида [57] или протеоформ, к примеру, в случае одноаминокислотных замен [58] или ПТМ [59].

Предсказание белок-белковых взаимодействий с помощью сопоставления информации о структуре белка реализовано в программе PRISM [60]. При разработке этой системы использовали данные об известных трехмерных структурах, доступные в PDB (~5500 белков, идентичны <50%). Межбелковые контакты выделяли как совокупность атомов, расстояние между ван-дер-ваальсовыми радиусами которых было в пределах 5 Å. Всего была обработана 21 000 контактных площадок и выявлено 3800 характерных интерфейсных поверхностей, обеспечивающих контакты между субъединицами комплекса.

Домены являются наиболее консервативными участками белков и зачастую обеспечивают контактный интерфейс для взаимодействия между субъединицами комплекса. Метод ассоциации (association method, AS) — это один из первых методов предсказания домен-доменных взаимодействий, основанный на оценке количества доменных пар во взаимодействующих белках по отношению к встречаемости каждого домена в паре в независимой выборке [61]. Несколько позже Deng et al. предложили алгоритм, где взаимодействие доменов предсказывается путем оценки максимального правдоподобия данного ББВ [62]. Другими подходами к выявлению белковых взаимодействий на уровне доменов являются: метод линейного программирования (linear programming, LP) и его модификации для выявления бинарных и комплексных взаимодействий [63]; метод опорных векторов; метод моделирования вероятностных сетей (probabilistic network modeling) и др. [64].

На основе домен-доменных взаимодействий для сплайс-форм предсказываются партнеры в виде нативных вариантов белков [31], а также в виде сплайс-форм [65], белковые партнеры для протеоформ с различными ПТМ [66] или одноаминокислотными заменами [67].

# МЕТОДЫ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ТЕКСТОВ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ (TEXT-MINING)

Данные о взаимосвязанных белках (ББВ) могут быть получены на основе автоматического анализа текстов научных публикаций (textmining) [68].

Методы быстрого и надежного извлечения данных из научной литературы – современная необходимость. Совершенствование экспериментальных постгеномных методов ведет к экспоненциальному росту количества статей, предоставляя, с одной стороны, «большие данные» для анализа, а с другой – глобальный вызов разработчикам биоинформатических систем для обработки данных. По состоянию на 2019 год наиболее широко используемая база данных биомедицинской литературы содержит ~30 млн ссылок, при этом для 5 млн из них полнотекстовая версия статьи представлена в открытом доступе в ресурсе PubMedCentral (данные на март 2019 года). Автоматический анализ накопленных в форме научных публикаций знаний в области взаимодействий белков во многом является основой для получения новых сведений о молекулярных механизмах возникновения заболеваний человека, а также методах диагностики, профилактики и лечения.

Большинство исследований в области извлечения информации о ББВ из текстов научных публикаций основаны на анализе резюме научных публикаций, поскольку это наиболее доступная часть статьи [68]. Для автоматического выявления в текстах данных о белок-белковых взаимодействиях используют созданные вручную правила поиска или заранее размеченный куратором набор текстов, на основе автоматического анализа которого создаются правила для последующего поиска взаимосвязей [69].

Наиболее простые алгоритмы, используемые для выявления ББВ, базируются на анализе частот совместного упоминания названий белков или генов в заданном фрагменте текста. Поиск такого рода взаимосвязей основан на гипотезе, что, вероятно, два белка взаимодействуют друг с другом, если они встречаются совместно в тексте одной [70] или близких по смыслу публикациях [71]. Очевидным недостатком этого подхода является существенное количество ложноположительных результатов. Снижение количества ложноположительных результатов может достигаться за счет использования дополнительных правил, но воспроизводимость полученных результатов при этом остается невысока [72].

Следующее поколение методов анализа текстов для выявления ББВ основано на ма-

шинном обучении [69]. Показано, что использование таких методов позволяет существенно снизить количество ложноположительных результатов. Методы динамического программирования, сходные с методами выравнивания последовательностей, могут быть использованы для нахождения шаблонов в размеченных текстах и поиска ББВ [73].

Перспективным считается предсказание взаимодействующих белков с использованием ядерных методов (kernel-based approaches) — класса алгоритмов для распознавания образов [74]. Тем не менее недостатком использования таких методов является отсутствие информации о семантических взаимосвязях между объектами — названиями белков. Решением этой проблемы является использование для построения интерактомной карты триплетов (триплет состоит из названий двух белков и связанного с ними термина, характеризующего взаимосвязь), которые могут быть найдены с использованием байесовских методов машинного обучения.

Зачастую существенного улучшения результатов предсказания ББВ удается достичь за счет комбинирования различных методических подходов [75] или интеграции многомерных данных [76]. Для извлечения триплетов, характеризующих ББВ, в 2018 году в работе, выполненной Yu et al. [69], использовали методы анализа текстов на естественном языке (nature language processing). Взаимосвязь может быть описана произвольным термином или термином, присутствующим в заранее сформированном словаре. Полученные триплеты затем были разделены на «истинные» и «ложные», что позволило достичь существенного преимущества в точности предложенного алгоритма в сравнении с существующими решениями. Для планирования эксперимента или актуализации сведений в базах данных точность аналитического алгоритма предсказания ББВ имеет большее значение, чем высокие показатели воспроизводимости результата [69].

В настоящее время создано внушительное количество систем, позволяющих реконструировать интерактомную карту как в гено-центричном формате, так и находить взаимосвязи между протеоформами. Методы анализа текстов используют в основном для предсказания ББВ между фосфорилированными формами [77].

#### ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПРИ AP-MS

Биоинформатические подходы востребованы и для анализа интерактомных данных, полу-

ченных масс-спектрометрически для комплексов после аффинного выделения. С одной стороны, особенностью таких экспериментов является сложность идентификации белков, заключающаяся в ограниченном количестве получаемых уникальных пептидов, по которым возможно безошибочно определить белок. Кроме того, возможна ошибочная идентификация пептида, возникающая в результате неверной интерпретации масс-спектра [15]. С другой стороны, велика вероятность получения ложноположительных результатов комплексных взаимодействий, обусловленных неспецифическими взаимодействиями из-за высокой концентрации белков в биоматериале, или же ложноотрицательных результатов в силу разрушения белкового комплекса при экстракции [5].

Для решения указанных выше проблем были разработаны различные биоинформатические подходы [78] и базы данных распространенных белков-контаминантов (CRAPome). В первую очередь используют статистические пороги (t-критерий, p-value), полученные на основе масс-спектров для белка-«наживки» и для контрольного образца [79].

Вопрос о статистической значимости оценки белковых взаимодействий на основе массспектрометрических данных был решен в рамках программ SAINT (Significance Analysis of INTeractome) [80] и ComPASS (Comparative Proteomics Analysis Software Suite) [81]. В качестве критерия для исключения ложноположительных результатов в программах используется распространенная в протеомике относительная количественная оценка содержания белка в пробе — «счетчик спектров» (spectral count). Она определяется путем подсчета количества массспектров фрагментации, относящихся к белку пептидов. Большие значения счетчика характеризуют более высокий уровень содержания белка в исследуемом образце. Близкие по идеологии программы незначительно отличаются эффективностью в пользу SAINT [15].

С помощью SAINT можно не только подтверждать специфические бинарные взаимодействия между белками, но и выявлять новые белковые взаимодействия. Например, при анализе результатов масс-спектрометрических экспериментов для серин/треонин фосфатазы PP5 было установлено ранее неизвестное взаимодействие со стресс-индуцированным фосфопротеином 1 (STIP 1) [82].

Другой метод анализа достоверности ББВ, выявленных с помощью AP-MC — MiST (Mass spectrometry interaction STatistics), основан на интегрированной оценке по нескольким параметрам: содержанию белка (интенсивности пи-

ка), воспроизводимости (повторяемости белкового комплекса) и специфичности (уникальности белка-«добычи» по отношению к другим белкам в комплексе) взаимодействия [83].

Несколько идеологически отличается алгоритм SFINX (Straightforward Filtering INdeX) [84], в рамках которого мета-данные анализируются автоматически — нет указания белка-«наживки» в результатах AP-MS, используется не счетчик спектров, а оценка интенсивности сигналов, относящихся к пептидам. Данный метод самостоятельно определяет пороговую величину достоверности в каждом случае на основе биномиального распределения.

Для оценки ложноположительных результатов, возникающих в первую очередь из-за контаминации, были разработаны методы CRAPome [85] и Decontaminator [86], в основе которых лежит оценка частоты встречаемости в различных экспериментах.

В качестве входных данных для методов вычислительной интерактомики используются результаты масс-спектрометрических экспериментов, выполненных после аффинного выделения белкового комплекса. Большое количество таких экспериментов депонируется в централизованные протеомные репозитории. Для многих экспериментов при этом отсутствуют мета-данные, например, в репозитории GPMdb [87], которые бы указывали, что результаты идентификации белков были получены в рамках исследования интерактома. В работе Zhang et al. [88] был предложен метод, позволяющий в автоматическом режиме извлечь из репозитория данные, которые с наибольшей вероятностью относятся к анализу белковых взаимодействий. В основе метода лежит идея о том, что частота совместно встречающихся белков в результатах AP-MS будет высока для обоих белковых партнеров.

Методы панорамной масс-спектрометрии позволяют выявлять протеоформы без дополнительных трудозатрат – путем использования расширенных библиотек и настроек при анализе масс-спектра. На сегодняшний момент экспериментальная база данных ББВ IntACT [89] является единственным ресурсом, поддерживаюшим публикацию идентифицированных сплайс-форм и их взаимодействий. Необработанные масс-спектры интерактомных экспериментов депонируются непосредственно в протеомные репозитории PRIDE [90], GPMdb [87] и PeptideAtlas [91]. В случае top-down подхода в масс-спектрометрии был разработан биоинформатический способ анализа белковых комплексов, образованных в том числе различными типами протеоформ [30].

#### БАЗЫ ДАННЫХ

Многие биоинформатические алгоритмы используют опубликованные сведения о ББВ для настройки или определения ложных результатов. Полученные результаты публикуются в виде баз данных. Практически каждый метод имеет свой ресурс, однако в силу того что есть базы данных, агрегаторы, и количество новых интерактомных ресурсов возрастает с каждым годом, некоторые ресурсы перестают поддерживаться. Данные могут обновляться постоянно или с некой периодичностью (версией ресурса), а могут быть статичными.

Ниже приведен список актуальных и наиболее распространенных баз данных ББВ человека (таблица). Можно выделить две группы интерактомных ресурсов — специализирующихся на конкретном организме (например, содержащих данные только для человека) и на конкретном типе данных (предсказанные ББВ, экспериментально подтвержденные ББВ, комбинированные).

Суммарно для человека имеются данные о нескольких миллионах белковых взаимодействий. Многие ресурсы интегрируют различные дополнительные сведения — о клеточной локализации [92], уровне экспрессии [93], свойствах гомологичных белков у других организмов [94] и т.д. Отдельно стоит упоминать базы данных, описывающие межорганизменные взаимодействия (в частности, человека с вирусами) [95]. Тем не менее данные ресурсов совпадают не более чем на 10—20% [39], в связи с чем возникает необходимость разработки новых алгоритмов предсказания и анализа ББВ.

#### ИНТЕРАКТОМНЫЕ СЕТИ

Использование биоинформатических методов позволяет визуализировать сети (или карты) ББВ. Визуализация дает представление о роли каждого белка в биологических процессах, а также позволяет выявлять новые белковые взаимодействия на основе построенных карт. Примером служит работа Kovács et al. [96], где на основе структурных и эволюционных данных показали, что белки, взаимодействующие через одного партнера, на самом деле в ряде случаев взаимодействуют напрямую.

Перед алгоритмами визуализации интерактомных карт стоит несколько задач: 1) совместимость с различными форматами сведений о ББВ, 2) воспринимаемый формат визуализации с возможностью масштабирования и 3) анализ сетей различными методами (кластеризация, анализ графа и т.д.), включая возможность подключе-

Интерактомные ресурсы, содержащие сведения о ББВ человека

База данных	Ссылка	По типу данных	Количество ББВ для человека	Обновляемость	
	Специализированная д.	ля человека			
BioPlex	http://bioplex.hms.harvard.edu/	экспериментальная	56 000	периодически обновляемая	
HAPPI	http://discovery.informatics.uab.edu/HAPPI/	комбинированная	2 922 202	статичная	
HPID	http://wilab.inha.ac.kr/hpid/	комбинированная	9000	периодически обновляемая	
HPRD	http://www.hprd.org/	комбинированная	41 327	статичная	
PepCyber: P-Pep	http://www.pepcyber.org/PPEP/	предсказательная	11 269	статичная	
TissueNet	http://netbio.bgu.ac.il/tissuenet/	предсказательная	243 706	периодически обновляемая	
UniHI	http://www.unihi.org/	предсказательная	573 995	периодически обновляемая	
Содержащая данные для различных организмов					
APID	http://cicblade.dep.usal.es:8080/APID/init.action	комбинированная	385 438	постоянно обновляемая	
BioGRID	https://thebiogrid.org/	комбинированная	496 730	постоянно обновляемая	
ComPPI	http://ComPPI.LinkGroup.hu	комбинированная	1 311 184	статичная	
DIP	https://dip.mbi.ucla.edu/dip/	комбинированная	9141	периодически обновляемая	
IID	http://iid.ophid.utoronto.ca/	комбинированная	975 877	периодически обновляемая	
IntACT	https://www.ebi.ac.uk/intact/	экспериментальная	~455 000	постоянно обновляемая	
I2D	http://ophid.utoronto.ca/ophidv2.204/	комбинированная	296 008	периодически обновляемая	
STRING	https://string-db.org/	комбинированная	~4 000 000	постоянно обновляемая	
MINT	https://mint.bio.uniroma2.it/	комбинированная	48 352	постоянно обновляемая	
3did	http://3did.irbbarcelona.org/	комбинированная	~6000	статичная	

ния дополнительной информации из других ресурсов. В качестве программ построения интерактомных карт наибольшую популярность получили Cytoscape, NAViGaTOR, VisAnt, ProViz и др. [97]. Первая интерактомная карта человека появилась в 2004 году [98]. Она была построена по гомологии с данными о белковых взаимодействиях модельных организмов: Saccharomyces cerevisiae, Drosophila melanogaster и Caenorhabditis

elegans. На основе анализа сведений о белковых взаимодействиях модельных организмов были выделены консервативные участки интерактома. Затем появились публикации по построению карты ББВ для человека на основе результатов, полученных высокопроизводительным методом двугибридной дрожжевой системы [99]. В 2007 году была сконструирована первая карта на основе данных метода AP-MS [100]. Сеть состоит

из вершин (белков), связанных ребрами (белокбелковые взаимодействия). По мере накопления сведений об интерактоме возник интерес к исследованию структур сетей.

В зависимости от расстояния между любыми двумя узлами в сети выделяют три структуры интерактомных сетей: «безразмерные» (scalefree network), «маленького мира» (small-word network) и «рандомные» (random network). В сетях «маленького мира» расстояния между узлами небольшие, в отличие от «безразмерных». «Рандомная» структура интерактомных сетей была предложена первой, но оказалась не самой удачной моделью, поскольку не включала в себя узловые белки, или белки-«центры» («hub») [101]. Особенностью узловых белков является повышенное количество взаимодействий по отношению к другим белкам, участвующим в сети.

Ключевая роль узловых белков проявляется в изменении биологического состояния [102]. Взаимодействия одного или нескольких белков-«центров» с компонентами белковой сети бывает достаточно для переключения клеточного процесса. Основная часть белков, участвующих в динамических процессах, экспрессируется независимо от узловых белков, образование которых происходит в течение всего процесса работы комплекса (статистические узловые белки) или обусловлено определенными условиями (динамические узловые белки) [103]. Динамичная модульная структура сети присуща различным видам биологических процессов, включая экспрессию генов, посттрансляционную модификацию и субклеточную организацию.

Анализ сетей ББВ вычислительными и статистическими методами позволяет получать информацию об организации биологических систем [104]. Все больше внимания уделяется исследованию интерактомных карт в медицинском аспекте. Центральная гипотеза, лежащая в основе связи карт ББВ и фенотипа заболеваний, заключается в нарушении локальной или глобальной структуры сетей, приводящей к патологическим изменениям [102].

С помощью исследований интерактомных сетей возможно выявление новых аспектов клеточных процессов: не только при заболеваниях, включающих в том числе наркологические зависимости [105] и взаимодействия с вирусами [106], но и при поиске новых лекарств [107], в том числе антибиотиков [108]. Непосредственно

в выявлении новых механизмов развития заболеваний ключевым фактором становится изменение взаимодействий аберрантных протеоформ [109]. Именно анализ сетей ББВ способствовал развитию изучения протеоформ, которые уже рассматриваются и в клиническом аспекте [110].

Несмотря на активно развивающиеся подходы геномного и постгеномного анализа современная интерактомика невозможна без биоинформатических методов. Высокопроизводительные технологии генерируют огромные массивы молекулярных данных, но расшифровка этих данных подразумевает анализ их взаимодействий между собой. Построение интерактомных карт, равно как и их трактовка, возможны только с помощью методов биоинформатики. Переход к прецизионной медицине требует выявлять особенности «нормы» для каждого индивидуума. При сравнительно небольшом количестве белок-кодирующих генов гетерогенность на уровне протеома у человека значительна.

Для человека, согласно данным UniProt [17], вариатив протеоформ, кодируемых с одного гена, наибольший среди всех организмов, однако количество «нейтральных» и «аномальных» белковых молекул только предстоит узнать. На фоне перехода к прецизионной медицине выявление особенности «нормы» для каждого индивидуума — это вызов как для протеомики (детекция всех транслируемых протеоформ, в том числе органоспецифичных), так и для интерактомики (выявление критических протеоформ, характерных для развития патологических состояний). В данных вопросах биоинформатика является универсальным инструментом анализа на всех уровнях получения и интерпретации результатов, позволяя, в том числе, компенсировать ограничения экспериментальных методов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по теме «Построение интерактомной карты человека» (грант № 18-34-00879).

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Braun, P., and Gingras, A.-C. (2012) History of protein—protein interactions: from egg-white to complex networks, *Proteomics*, 12, 1478–1498, doi: 10.1002/pmic. 201100563.
- 2. Qi, Y., Bar-Joseph, Z., and Klein-Seetharaman, J. (2006) Evaluation of different biological data and computational classification methods for use in protein interaction prediction, *Proteins*, **63**, 490–500, doi: 10.1002/prot.20865.

- Snider, J., Kotlyar, M., Saraon, P., Yao, Z., Jurisica, I., and Stagljar, I. (2015) Fundamentals of protein interaction network mapping, *Mol. Syst. Biol.*, 11, 848, doi: 10.15252/ msb.20156351.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology, *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 2763–2788, doi: 10.3390/ijms10062763.
- Hakhverdyan, Z., Domanski, M., Hough, L.E., Oroskar, A.A., Oroskar, A.R., Keegan, S., and LaCava, J. (2015) Rapid, optimized interactomic screening, *Nat. Methods*, 12, 553–560, doi: 10.1038/nmeth.3395.
- Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions, *Nature*, 340, 245–246, doi: 10.1038/340245a0.
- 7. Riegel, E., Heimbucher, T., Höfer, T., and Czerny, T. (2017) A sensitive, semi-quantitative mammalian two-hybrid assay, *BioTechniques*, **62**, 206–214, doi: 10.2144/000114544.
- 8. Gaudinier, A., Tang, M., Bågman, A.-M., and Brady, S.M. (2017) Identification of protein—DNA interactions using enhanced yeast one-hybrid assays and a semiautomated approach, *Methods Mol. Biol.*, **1610**, 187–215, doi: 10.1007/978-1-4939-7003-2\_13.
- Glass, F., and Takenaka, M. (2018) The yeast three-hybrid system for protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, 1794, 195–205, doi: 10.1007/978-1-4939-7871-7\_12.
- Dunham, W.H., Mullin, M., and Gingras, A.-C. (2012) Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies, *Proteomics*, 12, 1576–1590, doi: 10.1002/pmic.201100523.
- 11. Morris, J.H., Knudsen, G.M., Verschueren, E., Johnson, J.R., Cimermancic, P., Greninger, A.L., and Pico, A.R. (2014) Affinity purification—mass spectrometry and network analysis to understand protein—protein interactions, *Nat. Prot.*, **9**, 2539–2554, doi: 10.1038/nprot.2014.164.
- 12. Serebriiskii, I.G., and Golemis, E.A. (2001) Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination, *Methods Mol. Biol.*, 177, 123–134, doi: 10.1385/1-59259-210-4:123.
- Florinskaya, A., Ershov, P., Mezentsev, Y., Kaluzhskiy, L., Yablokov, E., Medvedev, A., and Ivanov, A. (2018) SPR biosensors in direct molecular fishing: implications for protein interactomics, *Sensors*, 18, 1616, doi: 10.3390/ s18051616.
- Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2011) Технологии белковой интерактомики, Биоорганическая химия, 37, 8–21, doi: 10.1134/s1068162011010092.
- Nesvizhskii, A.I. (2012) Computational and informatics strategies for identification of specific protein interaction partners in affinity purification mass spectrometry experiments, *Proteomics*, 12, 1639–1655, doi: 10.1002/ pmic.201100537.
- Teng, Z., Guo, M., Liu, X., Tian, Z., and Che, K. (2017) Revealing protein functions based on relationships of interacting proteins and GO terms, *J. Biomed. Semantics*, 8, 27, doi: 10.1186/s13326-017-0139-8.
- 17. The UniProt Consortium (2008) The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.*, **36**, Suppl. 1, D190–D195, doi: 10.1093/nar/gkm895.
- Medvedev, A., Kopylov, A., Buneeva, O., Zgoda, V., and Archakov, A. (2012) Affinity-based proteomic profiling: problems and achievements, *Proteomics*, 12, 621–637, doi: 10.1002/pmic.201100373.
- Kiseleva, O., Poverennaya, E., Shargunov, A., and Lisitsa, A. (2017) Proteomic cinderella: customized analysis of bulky MS/MS data in one night, *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 16, doi: 10.1142/S021972001740011X.
- 20. Aebersold, R., Agar, J.N., Amster, I.J., Baker, M.S., Bertozzi, C.R., et al. (2018) How many human proteo-

- forms are there? *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 206–214, doi: 10.1038/nchembio.2576.
- 21. Ponomarenko, E.A., Poverennaya, E.V., Ilgisonis, E.V., Pyatnitskiy, M.A., Kopylov, A.T., Zgoda, V.G., and Archakov, A.I. (2016) The size of the human proteome: the width and depth, *Int. J. Anal. Chem.*, doi: 10.1155/2016/7436849.
- 22. Uversky, V.N. (2016) p53 proteoforms and intrinsic disorder: an illustration of the protein structure-function continuum concept, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, doi: 10.3390/ijms17111874.
- 23. Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., and Stamm, S. (2013) Function of alternative splicing, *Gene*, **514**, 1–30, doi: 10.1016/j.gene. 2012.07.083.
- 24. Pyatnitskiy, M., Karpov, D., Poverennaya, E., Lisitsa, A., and Moshkovskii, S. (2015) Bringing down cancer aircraft: searching for essential hypomutated proteins in skin melanoma, *PLoS One*, **10**, e0142819, doi: 10.1371/journal. pone.0142819.
- Plymire, D.A., Wing, C.E., Robinson, D.E., and Patrie, S.M. (2017) Continuous elution proteoform identification of myelin basic protein by superficially porous reversed-phase liquid chromatography and fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 89, 12030–12038, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02426.
- Nedelkov, D. (2017) Mass spectrometric studies of apolipoprotein proteoforms and their role in lipid metabolism and type 2 diabetes, *Proteomes*, 5, 27, doi: 10.3390/ proteomes5040027.
- Lacovich, V., Espindola, S.L., Alloatti, M., Pozo Devoto, V., Cromberg, L.E., Čarná, M.E., Giancarlo, F., Gallo, J.M., Bruno, L., Stokin, J.B., Avale, M.E., and Falzone, T.L. (2017) Tau isoforms imbalance impairs the axonal transport of the amyloid precursor protein in human neurons, *J. Neurosci.*, 37, 58–69, doi: 10.1523/JNEUROSCI. 2305-16.2017.
- Пономаренко Е.А., Поверенная Е.В., Ильгисонис Е.В., Копылов А.Т., Згода В.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2017) Перспективы исследования протеома человека, Вестник Российской академии наук, 87, 599—604, doi: 10.1134/S1019331617040049.
- Киселева О.И., Лисица А.В., Поверенная Е.В. (2018) Протеоформы: методы исследования и клинические перспективы, Молекулярная биология, 52, 394–410, doi: 10.7868/S0026898418030047.
- Skinner, O.S., Havugimana, P.C., Haverland, N.A., Fornelli, L., Early, B.P., Greer, J.B., and Kelleher, N.L. (2016) An informatic framework for decoding protein complexes by top-down mass spectrometry, *Nat. Methods*, 13, 237–240, doi: 10.1038/nmeth.3731.
- 31. Ghadie, M.A., Lambourne, L., Vidal, M., and Xia, Y. (2017) Domain-based prediction of the human isoform interactome provides insights into the functional impact of alternative splicing, *PLoS Comput. Biol.*, **13**, e1005717, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005717.
- 32. Hart, G.T., Ramani, A.K., and Marcotte, E.M. (2006) How complete are current yeast and human protein-interaction networks? *Genome Biol.*, 7, 120, doi: 10.1186/gb-2006-7-11-120.
- 33. Stumpf, M.P.H., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., and Wiuf, C. (2008) Estimating the size of the human interactome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6959–6964, doi: 10.1073/pnas.0708078105.
- 34. Kotlyar, M., Pastrello, C., Malik, Z., and Jurisica, I. (2019) IID 2018 update: context-specific physical protein–protein interactions in human, model organisms and domesticated species, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D581–D589, doi: 10.1093/nar/gky1037.

- 35. Vidal, M. (2016) How much of the human protein interactome remains to be mapped? *Sci. Signal.*, **9**, eg7, doi: 10.1126/scisignal.aaf6030.
- Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., and Emili, A. (2015) Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes, *Nature*, 525, 339–344, doi: 10.1038/nature14877.
- 37. Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., and Mann, M. (2015) A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances, *Cell*, **163**, 712–723, doi: 10.1016/j.cell. 2015.09.053.
- 38. Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Paulo, J.A., Cannon, J.R., Ting, L., Baltier, K., and Harper, J.W. (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks, *Nature*, **545**, 505–509, doi: 10.1038/nature22366.
- Luck, K., Sheynkman, G.M., Zhang, I., and Vidal, M. (2017) Proteome-scale human interactomics, *Trends Biochem. Sci.*, 42, 342–354, doi: 10.1016/j.tibs.2017. 02.006
- 40. Kotlyar, M., Rossos, A.E.M., and Jurisica, I. (2017) Prediction of protein—protein interactions, *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **60**, 8.2.1–8.2.14, doi: 10.1002/cpbi.38.
- 41. Zhang, M., Su, Q., Lu, Y., Zhao, M., and Niu, B. (2017) Application of machine learning approaches for protein–protein interactions prediction, *Med. Chem.*, 13, 506–514, doi: 10.2174/1573406413666170522150940.
- 42. Horvatovich, P., Lundberg, E.K., Chen, Y.-J., Sung, T.-Y., He, F., et al. (2015) Quest for missing proteins: update 2015 on chromosome-centric human proteome project, *J. Proteome Res.*, **14**, 3415–3431, doi: 10.1021/pr5013009.
- 43. Bradford, J.R., Needham, C.J., Bulpitt, A.J., and Westhead, D.R. (2006) Insights into protein—protein interfaces using a Bayesian network prediction method, *J. Mol. Biol.*, **362**, 365–386, doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.028.
- Jansen, R., Yu, H., Greenbaum, D., Kluger, Y., Krogan, N.J., Chung, S., and Gerstein, M. (2003) A Bayesian networks approach for predicting protein—protein interactions from genomic data, *Science*, 302, 449–53, doi: 10.1126/ science.1087361.
- Scott, M.S., and Barton, G.J. (2007) Probabilistic prediction and ranking of human protein—protein interactions., *BMC bioinformatics*, 8, 239, doi: 10.1186/1471-2105-8-239
- Chatterjee, P., Basu, S., Kundu, M., Nasipuri, M., and Plewczynski, D. (2011) PPI\_SVM: prediction of protein-protein interactions using machine learning, domain-domain affinities and frequency tables, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 16, 264-278, doi: 10.2478/s11658-011-0008-x.
- 47. Guo, Y., Sheng, Q., Li, J., Ye, F., Samuels, D.C., and Shyr, Y. (2013) Large scale comparison of gene expression levels by microarrays and RNAseq using TCGA data, *PLoS One*, 8, e71462, doi: 10.1371/journal.pone.0071462.
- Zahiri, J., Bozorgmehr, J., and Masoudi-Nejad, A. (2013) Computational prediction of protein–protein interaction networks: algorithms and resources, *Curr. Genomics*, 14, 397–414, doi: 10.2174/1389202911314060004.
- 397–414, doi: 10.2174/1389202911314060004.
  49. Bartoli, L., Martelli, P.L., Rossi, I., Fariselli, P., and Casadio, R. (2010) The prediction of protein–protein interacting sites in genome-wide protein interaction networks: the test case of the human cell cycle, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 11, 601–608, doi: 10.2174/138920310794109157.
- McDowall, M.D., Scott, M.S., and Barton, G.J. (2009) PIPs: human protein—protein interaction prediction database, *Nucleic Acids Res.*, 37, D651–D656, doi: 10.1093/ nar/gkn870.
- 51. Garzón, J.I., Deng, L., Murray, D., Shapira, S., Petrey, D., and Honig, B. (2016) A computational interactome and

- functional annotation for the human proteome, *eLife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.18715.
- 52. Dick, K., and Green, J.R. (2018) Reciprocal perspective for Improved protein—protein interaction prediction, *Sci. Rep.*, **8**, 11694, doi: 10.1038/s41598-018-30044-1.
- 53. Gromiha, M.M., Yugandhar, K., and Jemimah, S. (2017) Protein–protein interactions: scoring schemes and binding affinity, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **44**, 31–38, doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.016.
- 54. Gemovic, B., Sumonja, N., Davidovic, R., Perovic, V., and Veljkovic, N. (2018) Mapping of protein—protein interactions: web-based resources for revealing interactomes, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 3890–3910, doi: 10.2174/0929867325666180214113704.
- Velankar, S., and Kleywegt, G.J. (2011) The Protein Data Bank in Europe (PDBe): bringing structure to biology, Acta Crystallogr. D, 67, 324–330, doi: 10.1107/ S090744491004117X.
- Aloy, P., and Russell, R.B. (2002) The third dimension for protein interactions and complexes, *Trends Biochem. Sci.*, 27, 633–638.
- 57. Fang, Y., Sun, M., Dai, G., and Ramain, K. (2016) The intrinsic geometric structure of protein—protein interaction networks for protein interaction prediction, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.*, **13**, 76–85, doi: 10.1109/TCBB.2015.2456876.
- Tuncbag, N., Keskin, O., Nussinov, R., and Gursoy, A. (2017) Prediction of protein interactions by structural matching: prediction of PPI networks and the effects of mutations on PPIs that combines sequence and structural information, *Methods Mol. Biol.*, 1558, 255–270, doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4\_12.
- Su, M.-G., Weng, J.T.-Y., Hsu, J.B.-K., Huang, K.-Y., Chi, Y.-H., and Lee, T.-Y. (2017) Investigation and identification of functional post-translational modification sites associated with drug binding and protein—protein interactions, *BMC Systems Biology*, 11, 132, doi: 10.1186/s12918-017-0506-1.
- 60. Keskin, O., Nussinov, R., and Gursoy, A. (2008) PRISM: protein—protein interaction prediction by structural matching, *Methods Mol. Biol.*, **484**, 505–521, doi: 10.1007/978-1-59745-398-1\_30.
- Sprinzak, E., and Margalit, H. (2001) Correlated sequence-signatures as markers of protein–protein interaction, *J. Mol. Biol.*, 311, 681–692, doi: 10.1006/ imbi.2001.4920.
- 62. Deng, M., Mehta, S., Sun, F., and Chen, T. (2002) Inferring domain–domain interactions from protein–protein interactions, *Genome Res.*, 12, 1540–1548, doi: 10.1101/gr.153002.
- 63. Hayashida, M., Ueda, N., and Akutsu, T. (2004) A simple method for inferring strengths of protein—protein interactions, *Genome Inform.*, 15, 56–68.
- 64. Raghavachari, B., Tasneem, A., Przytycka, T.M., and Jothi, R. (2008) DOMINE: a database of protein domain interactions, *Nucleic Acids Res.*, **36**, D656–D661, doi: 10.1093/nar/gkm761.
- Tseng, Y.-T., Li, W., Chen, C.-H., Zhang, S., Chen, J.J., Zhou, X., and Liu, C.-C. (2015) IIIDB: a database for isoform-isoform interactions and isoform network modules, *BMC Genomics*, 16, S10, doi: 10.1186/1471-2164-16-S2-S10.
- Tay, A.P., Pang, C.N.I., Winter, D.L., and Wilkins, M.R. (2017) PTMOracle: a cytoscape app for covisualizing and coanalyzing post-translational modifications in protein interaction networks, *J. Proteome Res.*, 16, 1988–2003, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b01052.
- 67. Ivanov, A.A., Revennaugh, B., Rusnak, L., Gonzalez-Pecchi, V., Mo, X., Johns, M.A., and Fu, H. (2018) The

- OncoPPi Portal: an integrative resource to explore and prioritize protein—protein interactions for cancer target discovery, *Bioinformatics*, **34**, 1183–1191, doi: 10.1093/bioinformatics/btx743.
- Skusa, A., Rüegg, A., and Köhler, J. (2005) Extraction of biological interaction networks from scientific literature, *Briefings Bioinform.*, 6, 263–276.
   Yu, K., Lung, P.-Y., Zhao, T., Zhao, P., Tseng, Y.-Y., and
- Yu, K., Lung, P.-Y., Zhao, T., Zhao, P., Tseng, Y.-Y., and Zhang, J. (2018) Automatic extraction of protein—protein interactions using grammatical relationship graph, *BMC Med. Inform. Decis. Mak.*, 18, 42, doi: 10.1186/s12911-018-0628-4.
- Stapley, B.J., and Benoit, G. (2000) Biobibliometrics: information retrieval and visualization from co-occurrences of gene names in Medline abstracts, *Pac. Symp. Biocomput.*, 2000, 529–540.
- Пономаренко Е.А., Лисица А.В., Ильгисонис Е.В., Арчаков А.И. (2010) Создание семантических сетей белков с использованием Pubmed/Medline, Молекулярная биология, 44, 152–161, doi: 10.1134/ S0026893310010176.
- 72. Lee, J., Kim, S., Lee, S., Lee, K., and Kang, J. (2013) On the efficacy of per-relation basis performance evaluation for PPI extraction and a high-precision rule-based approach, *BMC Med. Inform.Decis. Mak.*, 13 Suppl 1, S7, doi: 10.1186/1472-6947-13-S1-S7.
- 73. Huang, M., Zhu, X., Hao, Y., Payan, D.G., Qu, K., and Li, M. (2004) Discovering patterns to extract protein—protein interactions from full texts, *Bioinformatics*, **20**, 3604–3612, doi: 10.1093/bioinformatics/bth451.
- 74. Murugesan, G., Abdulkadhar, S., and Natarajan, J. (2017) Distributed smoothed tree kernel for protein—protein interaction extraction from the biomedical literature, *PLoS One*, **12**, e0187379, doi: 10.1371/journal.pone.0187379.
- 75. Niu, Y., and Wang, Y. (2015) Protein—protein interaction identification using a hybrid model, *Artif. Intell. Med.*, **64**, 185–193, doi: 10.1016/j.artmed.2015.05.003.
- Chang, J.-W., Zhou, Y.-Q., Ul Qamar, M.T., Chen, L.-L., and Ding, Y.-D. (2016) Prediction of protein-protein interactions by evidence combining methods, *Int. J. Mol. Sci.*, 17, E1946, doi: 10.3390/ijms17111946.
- Wang, Q., Ross, K.E., Huang, H., Ren, J., Li, G., Vijay-Shanker, K., and Arighi, C.N. (2017) Analysis of protein phosphorylation and its functional impact on protein—protein interactions via text mining of the scientific literature, *Methods Mol. Biol.*, 1558, 213–232, doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4 10.
- 78. Armean, I.M., Lilley, K.S., and Trotter, M.W.B. (2013) Popular computational methods to assess multiprotein complexes derived from label-free affinity purification and mass spectrometry (AP-MS) experiments, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 1–13, doi: 10.1074/mcp.R112.019554.
- Fernández, E., Collins, M.O., Uren, R.T., Kopanitsa, M.V., Komiyama, N.H., Croning, M. D.R., and Grant, S.G.N. (2009) Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins, *Mol. Syst. Biol.*, 5, 269, doi: 10.1038/msb.2009.27.
- Choi, H., Larsen, B., Lin, Z.-Y., Breitkreutz, A., Mellacheruvu, D., Fermin, D., and Nesvizhskii, A.I. (2011) SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data, *Nat. Methods*, 8, 70–73, doi: 10.1038/nmeth.1541.
- 81. Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2009) Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape, *Cell*, **138**, 389–403, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.042.
- 82. Skarra, D.V., Goudreault, M., Choi, H., Mullin, M., Nesvizhskii, A.I., Gingras, A.-C., and Honkanen, R.E.

- (2011) Label-free quantitative proteomics and SAINT analysis enable interactome mapping for the human Ser/Thr protein phosphatase 5, *Proteomics*, 11, 1508–1516, doi: 10.1002/pmic.201000770.
- 83. Verschueren, E., Von Dollen, J., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Sali, A., and Krogan, N.J. (2015) Scoring large-scale affinity purification mass spectrometry datasets with MiST, *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **49**, 8.19.1–8.19.16, doi: 10.1002/0471250953.bi0819s49.
- 84. Titeca, K., Meysman, P., Gevaert, K., Tavernier, J., Laukens, K., Martens, L., and Eyckerman, S. (2016) SFINX: straightforward filtering index for affinity purification—mass spectrometry data analysis, *J. Proteome Res.*, 15, 332–338, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00666.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N.A., Li, T., and Nesvizhskii, A.I. (2013) The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data, *Nat. Methods*, 10, 730–736, doi: 10.1038/nmeth.2557.
- 86. Lavallée-Adam, M., Cloutier, P., Coulombe, B., and Blanchette, M. (2011) Modeling contaminants in AP-MS/MS experiments, *J. Proteome Res.*, **10**, 886–895, doi: 10.1021/pr100795z.
- 87. Craig, R., Cortens, J.P., and Beavis, R.C. (2004) Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data, *J. Proteome Res.*, **3**, 1234–1242, doi: 10.1021/pr049882h.
- 88. Zhang, C., Rogalski, J.C., Evans, D.M., Klockenbusch, C., Beavis, R.C., and Kast, J. (2011) *In silico* protein interaction analysis using the global Proteome Machine Database Research articles, *J. Proteome Res.*, **10**, 656–668.
- 89. Kerrien, S., Aranda, B., Breuza, L., Bridge, A., Broackes-Carter, F., Chen, C., and Hermjakob, H. (2012) The IntAct molecular interaction database in 2012, *Nucleic Acids Res.*, **40**, D841–D846, doi: 10.1093/nar/gkr1088.
- Jones, P., Côté, R.G., Cho, S.Y., Klie, S., Martens, L., Quinn, A.F., and Hermjakob, H. (2008) PRIDE: new developments and new datasets, *Nucleic Acids Res.*, 36, D878–D883, doi: 10.1093/nar/gkm1021.
- 91. Deutsch, E.W. (2010) The PeptideAtlas Project, *Methods Mol. Biol.*, **604**, 285–296, doi: 10.1007/978-1-60761-444-9 19.
- 92. Veres, D.V., Gyurkó, D.M., Thaler, B., Szalay, K.Z., Fazekas, D., Korcsmáros, T., and Csermely, P. (2015) ComPPI: a cellular compartment-specific database for protein-protein interaction network analysis, *Nucleic Acids Res.*, 43, D485–D493, doi: 10.1093/nar/gku1007.
- Basha, O., Barshir, R., Sharon, M., Lerman, E., Kirson, B.F., Hekselman, I., and Yeger-Lotem, E. (2017) The TissueNet v.2 database: a quantitative view of protein—protein interactions across human tissues, *Nucleic Acids Res.*, 45, D427—D431, doi: 10.1093/nar/gkw1088.
- 94. Brown, K.R., and Jurisica, I. (2005) Online Predicted Human Interaction Database, *Bioinformatics*, **21**, 2076–2082, doi: 10.1093/bioinformatics/bti273.
- 95. Rozenblatt-Rosen, O., Deo, R.C., Padi, M., Adelmant, G., Calderwood, M.A., Rolland, T., and Vidal, M. (2012) Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins, *Nature*, **487**, 491–495, doi: 10.1038/nature11288.
- 96. Kovács, I.A., Luck, K., Spirohn, K., Wang, Y., Pollis, C., Schlabach, S., and Barabási, A.-L. (2019) Network-based prediction of protein interactions, *Nat. Commun.*, **10**, 1240, doi: 10.1038/s41467-019-09177-y.
- 97. Agapito, G., Guzzi, P.H., and Cannataro, M. (2013) Visualization of protein interaction networks: problems and solutions, *BMC Bioinformatics*, **14**, Suppl. 1, S1, doi: 10.1186/1471-2105-14-S1-S1.

- 98. Lehner, B., and Fraser, A.G. (2004) A first-draft human protein-interaction map, *Genome Biol.*, 5, R63, doi: 10.1186/gb-2004-5-9-r63.
- 99. Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., and Wanker, E.E. (2005) A human protein—protein interaction network: a resource for annotating the proteome, *Cell*, **122**, 957–968, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.029.
- 100. Ewing, R.M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., and Figeys, D. (2007) Large-scale mapping of human protein—protein interactions by mass spectrometry, *Mol. Syst. Biol.*, 3, 89, doi: 10.1038/msb4100134.
- 101. Taylor, I.W., and Wrana, J.L. (2012) Protein interaction networks in medicine and disease, *Proteomics*, 12, 1706–1716, doi: 10.1002/pmic.201100594.
- 102. Li, Q., Chen, W., Song, M., Chen, W., Yang, Z., and Yang, A. (2019) Weighted gene co-expression network analysis and prognostic analysis identifies hub genes and the molecular mechanism related to head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Biol. Ther.*, 20, 750–759, doi: 10.1080/15384047.2018.1564560.
- 103. Taylor, I.W., Linding, R., Warde-Farley, D., Liu, Y., Pesquita, C., Faria, D., and Wrana, J.L. (2009) Dynamic modularity in protein interaction networks predicts breast cancer outcome, *Nat. Biotechnol.*, 27, 199–204, doi: 10.1038/nbt.1522.
- Sardiu, M.E., Gilmore, J.M., Groppe, B.D., Dutta, A., Florens, L., and Washburn, M.P. (2019) Topological scor-

- ing of protein interaction networks, *Nat. Commun.*, **10**, 1118, doi: 10.1038/s41467-019-09123-y.
- 105. Chen, S.-J., Liao, D.-L., Chen, C.-H., Wang, T.-Y., and Chen, K.-C. (2019) Construction and analysis of protein—protein interaction network of heroin use disorder, *Sci. Rep.*, **9**, 4980, doi: 10.1038/s41598-019-41552-z.
- 106. Ackerman, E.E., Kawakami, E., Katoh, M., Watanabe, T., Watanabe, S., Tomita, Y., and Kawaoka, Y. (2018) Network-guided discovery of influenza virus replication host factors, *mBio*, **9**, doi: 10.1128/mBio.02002-18.
- 107. Macalino, S.J.Y., Basith, S., Clavio, N.A.B., Chang, H., Kang, S., and Choi, S. (2018) Evolution of *in silico* strategies for protein—protein interaction drug discovery, *Molecules*, 23, 1963, doi: 10.3390/molecules23081963.
- Molecules, 23, 1963, doi: 10.3390/molecules23081963.

  108. Miho, E., Roškar, R., Greiff, V., and Reddy, S.T. (2019)

  Large-scale network analysis reveals the sequence space architecture of antibody repertoires, Nat. Commun., 10, 1321, doi: 10.1038/s41467-019-09278-8.
- 109. Soetkamp, D., Raedschelders, K., Mastali, M., Sobhani, K., Bairey Merz, C.N., and Van Eyk, J. (2017) The continuing evolution of cardiac troponin I biomarker analysis: from protein to proteoform, *Expert Rev. Proteomics*, **14**, 973–986, doi: 10.1080/14789450.2017.1387054.
- 110. Van der Burgt, Y.E.M., and Cobbaert, C.M. (2018) Proteoform analysis to fulfill unmet clinical needs and reach global standardization of protein measurands in clinical chemistry croteomics, *Clin. Lab. Med.*, **38**, 487–497, doi: 10.1016/j.cll.2018.05.001.

#### METHODS OF COMPUTATIONAL INTERACTOMICS FOR INVESTIGATION OF INTERACTIONS OF HUMAN PROTEOFORMS

#### Review

E. V. Poverennaya\*, O. I. Kiseleva, A. S. Ivanov, and E. A. Ponomarenko

Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; E-mail: k.poverennaya@gmail.com

Received March 25, 2019 Revised September 16, 2019 Accepted October 7, 2019

The human genome contains ca. 20,000 protein-coding genes, which could be translated into millions of unique protein species (proteoforms). Proteoforms coded by a single gene often differ in function, which implies differences in their protein partners. By interacting with each other, proteoforms create a network reflecting dynamics of cellular processes in an organism. Perturbations of protein—protein interactions cause changes in the network topology, which often trigger pathological processes. The study of proteoforms is a relatively new research area in proteomics, that is why there are relatively few experimental studies on interactions of proteoforms. Bioinformatics tools allow facilitating various tasks providing valuable complementary information to experimental data such as, for example, expanding the possibilities in investigation of interactions of proteoforms.

Keywords: protein-protein interactions, interactomics, bioinformatics

УДК 577.112

#### ШАПЕРОННАЯ И ИММУНОГЛОБУЛИНСВЯЗЫВАЮЩАЯ AKTИBHOCTИ Skp ИЗ Yersinia pseudotuberculosis\*

© 2020 Е.В. Сидорин\*\*, В.А. Хоменко, Н.Ю. Ким, Т.Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022 Владивосток, Россия; электронная почта: sev1972@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019 После доработки 20.08.2019 Принята к публикации 10.09.2019

Данная работа посвящена изучению шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активностей рекомбинантного белка Skp (rSkp) из Yersinia pseudotuberculosis с помощью методов динамического рассеяния света и поверхностного плазмонного резонанса. В качестве белков-субстратов использовали коммерческие образцы поликлонального IgG человека, а также Fc- и Fab-фрагменты IgG человека. Было показано, что активность rSkp сильно зависит от pH среды. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы с гидродинамическим радиусом до 10 нм шаперон образует с белками-субстратами при кислом значении pH буферного раствора. В этих условиях rSkp Y. pseudotuberculosis показывает наибольшую устойчивость к самоассоциации, максимальную аффинность связывания с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами и наиболее эффективно препятствует их агрегации, т.е. демонстрирует максимальную шаперонную активность. По мере увеличения pH среды сила взаимодействия rSkp c IgG и его фрагментами снижается, шаперон не может полностью предотвратить агрегацию белковых субстратов, но значительно замедляет этот процесс. Полученная информация может представлять практический интерес, поскольку стабильность терапевтических препаратов IgG является важной проблемой безопасности и эффективности их применения в медицине.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** шаперон Skp, Yersinia pseudotuberculosis, иммуноглобулин G человека, Fc- и Fab-фрагменты IgG, белок-белковые взаимодействия, динамическое рассеяние света, поверхностный плазмонный резонанс.

DOI: 10.31857/S0320972520010078

В современной литературе накоплено большое количество экспериментальных данных о полифункциональной активности белков. Одним из ярких примеров такого поведения биополимеров является белок шаперон Skp (seventeen kilodalton protein), широко представленный в энтеробактериях. Он относится к семейству гомологичных низкомолекулярных белков (14-20 кДа) с ярко выраженными основными свойствами (pI 9-10) [1-4]. Главными субстра-

Принятые сокращения: rSkp — рекомбинантный белок Skp (seventeen kilodalton protein); IgG — иммуноглобулин G человека; ДРС — динамическое рассеяние света; Z-average — средний гидродинамический радиус частиц образца (при анализе кумулянтов);  $R_{\rm H}$  — гидродинамический радиус частиц (при анализе распределения); ППР — поверхностный плазмонный резонанс;  $K_{\rm D}$  — кинетическая константа диссоциации комплекса;  $k_{\rm d}$  — константа скорости диссоциации комплекса;  $k_{\rm d}$  — константа скорости ассоциации комплекса;  $k_{\rm d}$  — константа скорости ассоциации комплекса;  $k_{\rm d}$  — резонансная единица (resonance unit).

тами Skp как шаперона являются белки наружной мембраны бактерий. Ѕкр избирательно связывает несвернутые белки наружной мембраны, когда они после транслокации через плазматическую мембрану перемещаются в периплазму, и защищает их от агрегации [5–7]. Кроме того, Skp также функционирует как шаперон, который помогает в сворачивании растворимых белков в периплазме бактерий [8]. В этом качестве Skp при его коэкспрессии увеличивает выход и способствует корректному фолдингу экспрессированных белков, включая полноразмерные иммуноглобулины (антитела), их Fab-фрагменты и многочисленные одноцепочечные производные [9-11]. Наряду со способностью взаимодействовать с белками наружной мембраны в качестве шаперона, белки Skp обладают и другими свойствами, которые могут быть биологически и физиологически значимыми. Они проявляют липополисахарид- и ДНК-связывающую активности [1, 2, 12, 13] и являются хемоаттрактантами для моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов [14]. Между Skp и антигеном гистосовместимости человека HLA-B27 существует мо-

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-150, 02.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

лекулярная мимикрия: в их аминокислотных последовательностях имеются гомологичные участки [15]. Это позволило предположить, что данные белки могут обладать свойствами антигенов, иммунологически перекрестно реагирующих с HLA-B27. В то же время показано, что гомологичные участки в последовательности Skp не распознаются гуморальной иммунной системой пациентов с заболеваниями, связанными с HLA-B27 [16].

Paнee нами было показано, что Skp Yersinia pseudotuberculosis обладает свойством неиммунным способом (минуя антигенсвязывающие участки IgG (антител)) связывать IgG человека и кролика как в виде мономера Skp [17], так и в форме гомотримера (Skp<sub>3</sub>) [18]. С помощью компьютерного моделирования были построены модели пространственной структуры Skp, Skp<sub>3</sub> и его комплексов с Fc- и Fab-фрагментами IgG1 человека. На основании полученных моделей было выявлено, что наиболее вероятные сайты связывания на молекуле иммуноглобулина находятся в области Fc- и Fab-фрагментов. Построенные модели свидетельствуют о том, что взаимодействие сразу двух молекул Skp3 с молекулой IgG вполне вероятно. Нами было также установлено, что Skp Y. pseudotuberculosis связывается с порообразующим белком Отр и фосфолипазой А из наружной мембраны этой бактерии [19].

Целью данной работы являлось определение качественных и количественных характеристик шаперонной и связывающей активностей Skp в отношении IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментов при разных значениях pH среды.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материалы.** В работе использовали Superdex 200 10/300 GL («GE Healthcare», США), акриламид («Serva», Германия); центрифужные пробирки для концентрирования с диаметром пор 3 кДа Amicon Ultra («Merck Millipore», Германия); Ds-Na, 96-луночные микропланшеты ProteOn, сенсорный чип GLC («Віо-Rad», США); набор окрашенных белков-маркеров («Fermentas», Литва); кумасси R-250 («Sigma», США); IgG человека и Fc-фрагмент IgG человека («ICN Biomedicals», США); Fab-фрагмент IgG человека («MP Biomedicals», США); БСА, овальбумин, химотрипсиноген, миоглобин, цитохром c («ICN Biomedicals», США); целлюлозные мембранные фильтры 0,45 мкм («Agilent», США); PBS, pH 7,4 («Helicon», Россия). Все остальные реактивы имели квалификацию х.ч. («Реахим», Россия), их использовали без дополнительной очистки.

В качестве буферных систем применяли PBS ( $10\,\mathrm{MM}\,\mathrm{NaH_2PO_4},\,137\,\mathrm{mM}\,\mathrm{NaCl},\,2\,\mathrm{mM}\,\mathrm{KCl},\,\mathrm{pH}\,7,4$ ); 50 или  $100\,\mathrm{mM}\,\mathrm{CH_3COONa/CH_3COOH},\,\mathrm{pH}\,5,0$  (буфер A); 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4 (буфер Б); 50 или  $100\,\mathrm{mM}\,\mathrm{Tris-HCl},\,\mathrm{pH}\,8,0$  (буфер В); 50 мМ CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH, pH 6,0 (буфер Г).

Подготовка образцов IgG человека, Fc- и Fabфрагментов IgG человека, rSkp из Y. pseudotuberculosis. С целью подготовки коммерческого образца каждого белка, выбранного в качестве белка-субстрата в реакции связывания с Skp Y. pseudotuberculosis, использовали гель-фильтрацию. Навеску каждого лиофилизованного белка растворяли в воде, полученные растворы пропускали через фильтр 0,45 мкм и проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 10/300 GL, предварительно уравновешенной раствором PBS. Образцы наносили на колонку в объеме 0,25 мл, скорость элюции составляла 0,5 мл/мин. Фракции объемом 0,5-0,7 мл, содержавшие белок, собирали и определяли интенсивность оптического поглощения элюата при 280 нм. Фракции объединяли по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза и концентрировали с помощью центрифужных пробирок для концентрирования (диаметр пор 3 кДа). Общее содержание белка в полученных образцах IgG, Fc- и Fab-фрагментов определяли методом Брэдфорд [20] с использованием лизоцима в качестве калибровочного белка.

Рекомбинантный белок Skp (rSkp) *Y. pseudotuberculosis* экспрессировали в *E. coli*, выделяли из клеток и очищали, как описано нами ранее [18]. Концентрацию rSkp *Y. pseudotuberculosis* определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм, принимая величину  $A_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$  равной 0,185 (Swiss-Prot, P31520 и Q667J8).

**Ds-Na-ПААГ-электрофорез.** Электрофорез проводили в присутствии Ds-Na по методу Лэммли [21]. Все образцы для электрофореза готовили без прогревания при 100 °C в буфере для образцов, не содержавшем меркаптоэтанол. В качестве маркеров использовали набор окрашенных белков с молекулярными массами 11, 17, 24, 33, 40, 55, 72, 100 и 130 кДа. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 45%-ном этаноле.

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Размер частиц, образованных rSkp *Y. рseudotu-berculosis*, белками-субстратами и их комплексами с шапероном в растворе, в зависимости от времени инкубации и рН (5,1; 6,7 и 7,9) определяли методом ДРС на приборе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенном He-Ne-лазером ( $\lambda = 633$  нм, 4 мВт), при угле 173°. Измерения проводили в кювете  $10 \times 10$  мм

при комнатной температуре (20 °C). Время накопления данных составляло 15—30 мин. Перед определением размеров частиц готовили смесь буферных растворов: 0,24 мл PBS + 0,34 мл 50 мМ буфера А + 0,62 мл либо 100 мМ буфера А (рН 5,1), либо 50 мМ буфера Б (рН 6,7), либо 100 мМ буфера В (рН 7,9). При выполнении экспериментов, в зависимости от задачи исследования, использовали PBS, содержавший либо IgG (0,15 мг/мл), либо Fc-фрагмент IgG (0,12 мг/мл), а также 50 мМ буфер А, содержавший гSkp (0,28 мг/мл).

Расчет Z-average (среднего гидродинамического радиуса частиц образца) и  $R_{\rm H}$  (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их объемного распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS, «Malvern», Великобритания).

Спектры КД. Спектры КД регистрировали на Chirascan-plus CD-спектрометре («Applied Photophysics», Великобритания) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 и 1 см для съемки спектров в пептидной и ароматической областях соответственно. В пептидной области спектра КД (190—240 нм) рассчитывали эллиптичность [θ] среднего остатка, принимая молекулярную массу последнего равной 110 Да, по формуле:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} S \times 110/(Cd)$$
 (град м<sup>2</sup> дмоль<sup>-1</sup>),

где S — чувствительность шкалы прибора; C — концентрация белка, мг/мл; d — толщина кюветы, см. В ароматической области спектра КД (240—320 нм) рассчитывали молярную эллиптичность  $[\theta]_{\rm M}$ , принимая молекулярную массу белка равной 16,1 кДа. Для снятия спектров КД rSkp при разных значениях pH среды белок переводили в составные буферные растворы со значениями pH 5,1; 6,7 и 7,9, как описано выше.

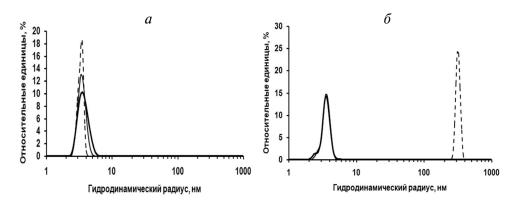
Определение олигомерной структуры rSkp Y. pseudotuberculosis. Подтверждение олигомерной структуры rSkp Y. pseudotuberculosis проводили в нативных условиях с помощью FPLС-хроматографа («Amersham Pharmacia Biotech», США) в буфере A методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL, как описано нами ранее [18]. Колонку предварительно калибровали с помощью белков с известными молекулярными массами: BCA - 67, овальбумин — 45, химотрипсиноген — 24, миоглобин — 18, цитохром c - 13 кДа. Относительная ошибка определения молекулярной массы составила 7%.

**Метод поверхностного плазмонного резонанса** (ППР). Для получения количественных характеристик взаимодействия Skp *Y. pseudotuberculo*-

sis с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами использовали метод ППР. Кинетику связывания rSkp (аналит) с иммобилизованными на поверхности сенсорного чипа GLC белками-субстратами (лиганды) определяли с помощью матричного биосенсора ProteOn XPR 36 («Bio-Rad», США). Ковалентную иммобилизацию лигандов на чипе проводили с использованием набора реактивов Amin Coupling Kit («Bio-Rad», США) согласно инструкции производителя. Уровень связывания лиганда контролировали по изменению сигнала биосенсора (RU – resonance unit, резонансная единица). Плотность посадки составила 1420 RU для IgG, 690 RU для Fc-фрагмента и 1060 RU для Fab-фрагмента IgG. В качестве контрольного канала служил канал без иммобилизованного белка. В ходе выполнения экспериментов использовали буферные системы: 50 мМ буферы А, Б, В и Г. Концентрацию аналита изменяли в интервале 0,1-5,0 мкМ. В каждом эксперименте стадии ассоциации и диссоциации аналита проводили при скорости потока 25 мкл/мин в течение 500 с. Все эксперименты осуществляли при температуре 25 °C. Регенерацию поверхности сенсорного чипа выполняли 50 мМ раствором NaOH при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 с. Для удаления возможных артефактов связывания экспериментальные данные, полученные на реакционных поверхностях лиганд-аналит, последовательно обрабатывали путем вычитания результатов, полученных на контрольных поверхностях (reference surfaces) и при введении буферных систем без образцов белка (blank injections). Дальнейший анализ сенсограмм проводили с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.0 («Bio-Rad», США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние рН среды на агрегацию Skp *Y. pseudo*tuberculosis. Наши наблюдения показали, что rSkp Y. pseudotuberculosis может длительное время храниться в буферных растворах с низкими значениями рН (4,0-5,0), сохраняя иммуноглобулинсвязывающую активность, но достаточно быстро (в течение недели) агрегирует и выпадает в осадок при нейтральных и основных значениях рН. Поэтому перед изучением шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активностей Skp Y. pseudotuberculosis методом динамического рассеяния света (ДРС) было исследовано поведение rSkp в растворах в зависимости от значения рН и времени инкубации. Полученные результаты представлены на рис. 1 и в табл. 1.



**Рис. 1.** Объемное распределение по размеру частиц rSkp *Y. pseudotuberculosis*: a- в буфере с pH 5,0, инкубация в течение 6 дней (сплошная толстая линия); в буфере с pH 6,7, инкубация в течение 4 ч (сплошная тонкая линия) и 24 ч (пунктирная линия);  $\delta-$  в буфере с pH 7,9, инкубация в течение 1 ч (сплошная толстая линия), 4 ч (сплошная тонкая линия) и 24 ч (пунктирная линия)

По данным метода ДРС, rSkp в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 5,0) имел в течение шести дней мономодальное распределение с преимущественным содержанием частиц с R<sub>н</sub> и Z-average, равными 3,8 и 6,4 нм соответственно (рис. 1, а; табл. 1). Подобное распределение частиц шаперона по R<sub>н</sub> также наблюдалось в течение первых 4 ч в растворах с нейтральным и щелочным значениями рН, но при этом величина Z-average образцов резко возрастала (табл. 1), что свидетельствует о начале процесса самоассоциации белка. Дальнейшая инкубация растворов в течение 24 ч приводила к еще большему увеличению Z-average и появлению изменений в распределении частиц по размерам: в растворе с рН 6,7 преимущественно сохранялись мелкие частицы (3,6 нм), в то время как в буфере с pH 7,9 частиц с  $R_H < 200$  нм не наблюдалось (рис.  $1, \delta$ ). Таким образом, можно сделать вывод о том, что при изменении значений рН среды от кислых к щелочным наблюдаются самоассоциация и агрегация rSkp Y. pseudotuberculosis, и скорость этих процессов увеличивается с возрастанием рН в направлении к изоэлектрической точке белка (рI 9,33).

**Таблица 1.** Средние значения гидродинамических радиусов (Z-average и  $R_H$ ) rSkp *Y. pseudotuberculosis* в водных растворах при разных значениях pH и сроках инкубации

Значение рН	Время инкубации	Z-average, нм	R <sub>H</sub> , нм
5,0	6 дней	6,4	3,8
6,7	4ч	61,1	3,7
	24ч	341,2	3,5
7,9	1 ч	155,3	4,0
	4 ч	153,9	4,6
	24 ч	382,6	319,2

**Пространственная структура rSkp.** Влияние рН на структуру белка изучали с помощью КДспектроскопии и ДРС. Спектры КД rSkp в буферных растворах с рН 5,0; 6,7 и 7,9 в дальней УФ-области имеют одинаковую интенсивность сигнала и форму с минимумами при 208 и 222 нм, что указывает на преобладание в белке α-структуры (рис. 2, а). Спектры остаются неизменными при инкубации белка в растворе в течение первых 24 ч (1, 4 и 24 ч). При дальнейшей выдержке rSkp (72 ч) при pH 5,0 характеристики спектра практически не изменяются, а при рН 6,7 и 7,9 заметно уменьшается амплитуда спектров при сохранении их формы, что может быть связано с присутствием в растворе белковых агрегатов, которые не определяются методом КД-спектроскопии [22].

Спектры КД rSkp в ближней УФ-области были использованы для выявления возможных трансформаций в третичной структуре белка при изменении рН среды (рис. 2, б). Как известно, спектры в области 260-320 нм обусловлены ароматическими аминокислотами. Зрелый Skp имеет два остатка Туг и четыре остатка Phe на мономер, часть из которых находится в конформационно гибкой области молекулы (α-спиральный домен в форме щупалец) [18, 23]. Как видно на рис. 2,  $\delta$ , наибольшую амплитуду и наиболее выраженную тонкую структуру (пики при 260 и 270 нм, характерные для Phe, и при 278 и 285 нм, относящиеся к Туг) имеет спектр белка в буфере с рН 5,0. При рН 6,7 наблюдаются небольшие изменения в спектре: немного уменьшается величина сигнала и высота пиков. Возрастание рН до 7,9 приводит к изменению знака спектра, дальнейшему уменьшению его амплитуды и сглаживанию при сохранении характеристических пиков. Увеличение времени инкубации белка от 1

до 72 ч не приводит к существенным изменениям в спектрах.

Согласно результатам ДРС, в интервале рН 5,0-8,0 наблюдается симметричное мономодальное распределение rSkp с небольшой шириной и  $R_{\rm H}$ , равным  $(3,7\pm0,3)$  нм (рис. 1). Как видно на рис. 2,  $\epsilon$ , рекомбинантный белок элюируется с колонки Superdex 200 10/300 GL в виде одного симметричного пика, который соответствует белку с кажущейся молекулярной массой  $(45,2\pm3,0)$  кДа и, следовательно, тримерной форме шаперона [18].

Таким образом, увеличение pH от 5,0 до 7,9 не оказывает влияния на вторичную и олигомерную структуру rSkp, но, возможно, вызывает некоторую дестабилизацию третичной структуры.

Влияние rSkp на агрегацию IgG и его фрагментов при разных значениях рН среды. В качестве белков-субстратов для связывания с шапероном rSkp использовали коммерческие образцы поликлонального IgG, Fc- и Fab-фрагменты IgG. Перед проведением экспериментов исследуемые белки дополнительно очищали с помощью гельпроникающей хроматографии на колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной раствором PBS. По данным ДРС, образец иммуноглобулина в PBS имел мономодальное объемное распределение по размерам,  $R_{\rm H}$  составлял (5,6  $\pm$  $\pm 0.5$ ) нм, что согласуется с размером мономера IgG, приведенным в литературе [24–27], и величину Z-average, равную 17 нм. Образцы Fc- и Fab-фрагментов IgG также демонстрировали мономодальное объемное распределение по размерам и имели величины Z-average 14 и 11 нм соответственно и  $R_H$  (3,3  $\pm$  0,3) нм, одинаковые для обоих белков.

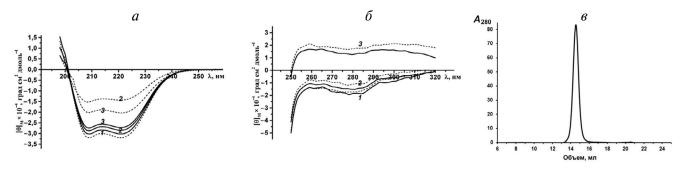
В последние годы большое внимание уделяется изучению стабильности биофармацевтических препаратов на основе биологически активных белков. Одним из таких белков, получивших широкое применение в медицине, является IgG. Изучение различных аспектов

взаимодействия и агрегации молекул IgG [28-30] и факторов, влияющих на эти процессы [31–34], представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес при разработке лекарственных препаратов. В данной работе мы наблюдали агрегацию IgG, Fc- и Fab-фрагментов при переводе из PBS в буферные растворы с меньшей ионной силой с кислым, нейтральным или основным значениями рН. Исследуемые белки демонстрировали увеличение Z-average, ширины распределения по размерам (мультимодальное распределение) и относительного содержания (%) частиц с  $R_H > 10$  нм. На рис. 3 приведены диаграммы относительного содержания (%) частиц при их объемном распределении по размеру ( $R_H$ ) и Z-average частиц, образованных белками-субстратами при разной длительности их инкубации в растворах при трех значениях рН (5,1; 6,7 и 7,9 соответственно) в отсутствие (рис. 3,  $a-\epsilon$ ) и в присутствии rSkp Y. pseudotuberculosis (рис. 3,  $\varepsilon$ -e).

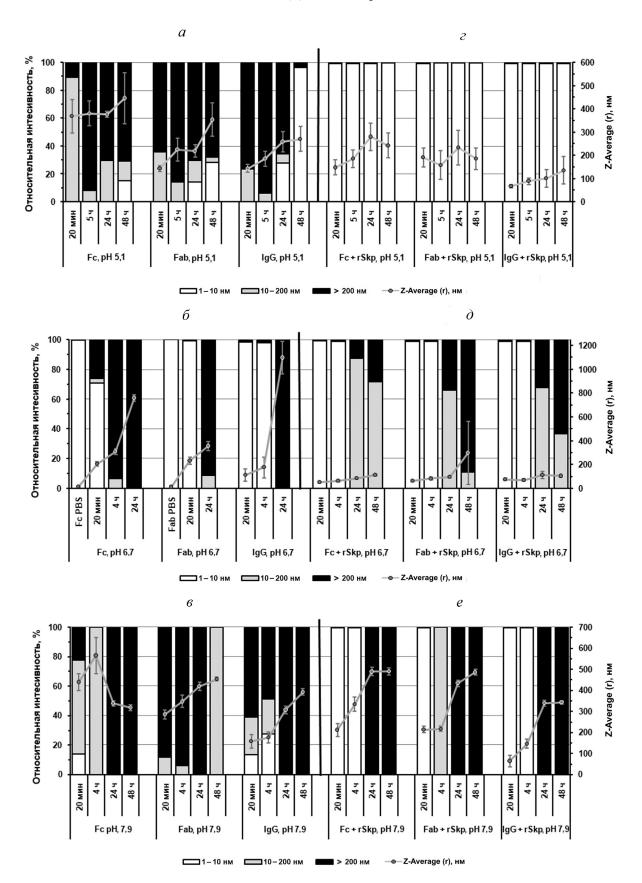
Как можно видеть из диаграмм, IgG, Fc- и Fab-фрагменты агрегируют с разной скоростью в зависимости от значения pH среды. При кислых и щелочных значениях pH (рис.  $3, a, \theta$ ) скорость агрегации исследуемых белков намного выше, чем в нейтральной среде (рис.  $3, \delta$ ), при этом в кислых условиях она максимальна.

Рост относительного содержания мелких частиц с  $R_H$  менее 10 и 200 нм при увеличении времени выдерживания в кислых растворах до 24 ч и более (рис. 3, a), вероятно, связан с образованием крупных седиментирующих агрегатов, которые выпадают в осадок из раствора и не учитываются при анализе.

С целью изучения возможных шаперонных свойств rSkp *Y. pseudotuberculosis* в отношении IgG и его фрагментов, т.е. его способности предотвращать агрегацию исследуемых белков, образуя с ними растворимые комплексы, в растворы иммуноглобулинов с разными значениями рН добавляли шаперон в молярном соотноше-



**Рис. 2.** Спектры КД rSkp в дальней (a) и ближней (b) областях УФ-спектра при значениях pH среды 5,0 (b), 6,7 (b) и 7,9 (b) в течение 1 ч (сплошная линия) и 72 ч (пунктирная линия). Гель-фильтрация rSkp (b) на колонке Superdex 200 HR в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0



**Рис. 3.** Объемное распределение по размеру ( $R_H$ ) и Z-average частиц, образованных белками-субстратами в растворе, в зависимости от времени инкубации и рН. Растворы белков в отсутствие (a–e) и в присутствии rSkp ( $\varepsilon$ –e)

нии Skp<sub>3</sub>: IgG (8:1) и Skp<sub>3</sub>: Fc- или Fab-фрагменты IgG (3,5:1) (в расчетах использовали молекулярную массу тримера Skp<sub>3</sub>). По данным ДРС, в присутствии rSkp скорость процессов самоассоциации и агрегации белков-субстратов существенно снижалась: рост относительного содержания (%) частиц с  $R_H > 10$  нм и значений Z-average образцов заметно замедлялся (рис. 3, z-e). В проведенных экспериментах наблюдалось значительное влияние рН среды на проявление rSkp шаперонной активности. В случае кислого значения рН раствора (в условиях наибольшей стабильности rSkp) шаперон образовывал с белками устойчивые (до 48 ч) низкомолекулярные комплексы с  $R_{\rm H}$  до 10 (99,5-99,8%; рис. 3, г). В растворах с нейтральным и щелочным значениями рН (6,7 и 7,9) шаперонная активность rSkp заметно снижалась (рис. 3,  $\partial$ , e). При этих значениях pH достаточно высокое (98,2-99,8%) относительное содержание образованных в первые 20 мин низкомолекулярных комплексов (R<sub>н</sub> до 10 нм) сохранялось в течение первых 4-5 ч. Исключение составил раствор, содержавший шаперон с Fab-фрагментом IgG при pH 7,9: образующиеся частицы имели R<sub>н</sub> в интервале 10-200 нм (100%). Дальнейшая инкубация растворов в течение 24 и 48 ч приводила к значительному увеличению доли крупных частиц (рис. 3,  $\theta$ , e), размер которых составлял 10-200 нм и более при рН 6,7 и свыше 200 нм (100%) при рН 7,9. Полученные результаты говорят о том, что при рН 6,7 и 7,9 rSkp не способен полностью предотвратить самоассоциацию и агрегацию IgG и его фрагментов, но может существенно замедлять эти процессы.

В последнее время появляется все больше данных о том, что нарушения в структуре белков, вызванные изменениями рН среды, влияют на их шаперонную активность [35–37]. Полученные результаты также хорошо демонстрируют рН-зависимый характер шаперонной активности rSkp Y. pseudotuberculosis. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы (R<sub>н</sub> до 10 нм) между шапероном и IgG, Fc- или Fabфрагментами образуются только при кислых значениях рН среды. При повышении рН шаперонная активность rSkp снижается, и агрегация белков-субстратов замедляется незначительно. На основании полученных нами данных можно предложить модель ингибирующего действия шаперона на рН-индуцированную агрегацию белков, согласно которой rSkp стабильно связывает белки-субстраты при низких значениях рН, тем самым предотвращая их необратимую агрегацию, рН-нейтрализация реакционной среды вызывает медленное высвобождение белков из их комплексов с шапероном.

По своим шаперонным свойствам Skp имеет сходство с недавно открытыми гомодимерными шаперонами HdeA и HdeB, которые обеспечивают устойчивость Escherichia coli к кислотному стрессу [38, 39]. Эти шапероны, подобно Skp, находятся в периплазме, имеют небольшую молекулярную массу, являются АТФ-независимыми и защищают белки периплазмы от разворачивания и агрегации в кислых условиях. Они активируются при низких значениях рН и функционируют в форме частично развернутых мономеров. В то же время Skp при кислых значениях pH, как было показано, сохраняет нативную вторичную и олигомерную структуру. Однако для того чтобы однозначно говорить о различии между вышеназванными шаперонами по свойствам и механизму действия, необходимо изучить шаперонную активность и структуру Skp при более низких значениях pH (< 5), при которых HdeA и HdeB активны и функционируют.

Кинетические характеристики связывания Skp с IgG, Fc- или Fab-фрагментами при разных значениях pH среды. Для изучения взаимодействия и определения количественных характеристик связывания Skp с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами при разных значениях pH среды использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

На рис. 4 представлены сенсограммы (экспериментальные и теоретические) связывания rSkp с IgG человека и его фрагментами при разных значениях рН среды. Количественные характеристики связывания: кинетическая константа диссоциации комплексов (Кр), главный параметр, определяющий силу связывания лиганд-аналит, константы скорости ассоциации и диссоциации комплексов (k<sub>a</sub> и k<sub>d</sub> соответственно) — приведены в табл. 2. Графические данные (рис. 4) и значения квадратичных отклонений  $(\chi^2, \text{ табл. 2})$  свидетельствуют в пользу того, что использованные для аппроксимации полученных результатов модели, согласно которым связывание rSkp c Fc- и Fab-фрагментами IgG наилучшим образом соответствует кинетической модели «двух состояний», а с IgG – модели «гетерогенного лиганда», можно считать удовлетворительными для расчета количественных характеристик межмолекулярных взаимодействий лиганд-аналит. Анализ связывания rSkp с белками-субстратами при одной концентрации шаперона и одном значении рН среды (5,0), но разной скорости протока аналита через ячейку (25, 35 и 45 мкл/мин; рис. 5) показал, что в реакции лиганд-аналит отсутствуют эффекты, ограничивающие массоперенос.

Константы диссоциации изученных комплексов имеют достаточно низкие значения, что

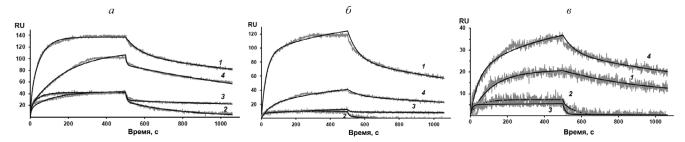
Иммуно- глобулин	рН	k <sub>a</sub> , 1/Ms	k <sub>d</sub> , 1/s	$K_{\rm D}1, \ k_{\rm d}/k_{\rm a}$	k <sub>a</sub> 2, 1/s	k <sub>d</sub> 2, 1/s	$K_D 2$ , $k_d/k_a$	$\frac{\chi^2}{RU}$
Fc-фрагмент	5,0	$(1,10\pm0,02)\times10^5$	$(9.1 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-8}$	$(2,1\pm0,1)\times10^{-3}$	$(6.8 \pm 0.7) \times 10^{-4}$	_	5,7
IgG	6,0	$(5,4\pm2,5)\times10^4$	$(1,4\pm0,3)\times10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-6}$	$(6,1\pm1,7)\times10^{-3}$	$(9.0 \pm 0.01) \times 10^{-1}$	_	2,1
	7,4	$(3.0 \pm 0.2) \times 10^5$	$(5,6\pm0,5)\times10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-7}$	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(2.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	_	0,8
	8,0	$(2,50 \pm 0,06) \times 10^4$	$(7,2\pm0,4)\times10^{-3}$	$2.9 \times 10^{-7}$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(4,4\pm0,2)\times10^{-4}$	_	2,9
Fab-фрагмент	5,0	$(7,7\pm0,3)\times10^4$	$(2,4\pm0,3)\times10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-8}$	$(8,1 \pm 1,4) \times 10^{-4}$	$(6,7 \pm 1,7) \times 10^{-5}$	_	2,1
IgG	6,0	$(1,6\pm0,3)\times10^5$	$(1,5\pm0,4)\times10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-7}$	$(8,2\pm1,6)\times10^{-3}$	$(4,400 \pm 0,006) \times 10^{-1}$	_	2,1
	7,4	$(5,0\pm0,6)\times10^4$	$(8,5\pm0,7)\times10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$(6.5 \pm 0.7) \times 10^{-4}$	$(8,7 \pm 3,4) \times 10^{-4}$	_	0,9
	8,0	$(4,10\pm0,08)\times10^4$	$(7.5 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-7}$	$(3.0 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(6.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	_	2,1
IgG	5,0	$(1,10\pm0,01)\times10^5$	$(6,1\pm0,2)\times10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-9}$	$(2,3\pm0,3)\times10^5$	$(1,6\pm0,07)\times10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-8}$	2,8
	6,0	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^5$	$(5,1\pm0,4)\times10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$(5,0\pm0,3)\times10^5$	$(3,6\pm0,2)\times10^{-2}$	$7,1 \times 10^{-8}$	2,9
	7,4	$(4,4\pm0,3)\times10^5$	$(1,10\pm0,03)\times10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$(9,1\pm0,6)\times10^4$	$(4,4000 \pm 0,0005) \times 10^{-3}$	$6.5 \times 10^{-7}$	2,5
	8,0	$(4,3\pm0,3)\times10^4$	$(4.7 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$(7,3\pm0,7)\times10^4$	$(7,3\pm0,8)\times10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-6}$	6,8
	I			1	I		1	I

**Таблица 2.** Количественные характеристики связывания rSkp с IgG человека, Fc- и Fab-фрагментами IgG при разных значениях pH среды

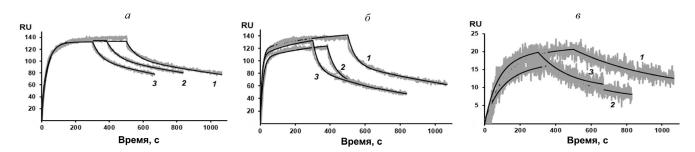
указывает на специфические взаимодействия между компонентами. Сила связывания rSkp с IgG человека и его фрагментами сильно зависит от значений pH среды: при pH 5,0 она является максимальной со всеми белками-субстратами и значительно уменьшается при увеличении pH (рис. 6, табл. 2). Уменьшение аффинности взаимодействия с ростом величины pH обусловлено

прежде всего значительным увеличением скорости диссоциации комплексов.

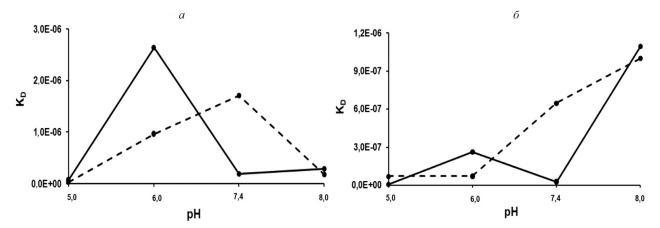
В условиях рН среды, близких к нейтральным (6,0 и 7,4), наблюдаются наибольшие различия в кинетике образования и распада комплексов rSkp с белками-лигандами. Если при увеличении рН от 6,0 к 7,4 характер изменения  $k_d$  комплексов для Fc- и Fab-фрагментов IgG оди-



**Рис. 4.** Сенсограммы связывания rSkp с IgG (a), Fc-фрагментом ( $\delta$ ) и Fab-фрагментом ( $\epsilon$ ) IgG человека в буферных растворах, pH среды: 5,0 (I), 6,0 (I), 7,4 (I) и 8,0 (I)



**Рис. 5.** Сенсограммы связывания rSkp с IgG (a), Fc-фрагментом ( $\delta$ ) и Fab-фрагментом (s) IgG человека в натрий-ацетатном буфере, pH 5,0, при скорости протока аналита 25 (I), 35 (I) и 45 (I) мкл/мин



**Рис. 6.** Зависимость  $K_D$  комплексов rSkp *Y. pseudotuberculosis* с IgG и его Fc- и Fab-фрагментами от pH среды. Взаимодействие шаперона: a-c Fc-фрагментом (сплошная линия) и Fab-фрагментом (пунктирная линия); b-c IgG человека; b-c ІдС

наков (уменьшение в 2,5 и 1,8 раза соответственно), то k<sub>a</sub> для Fc-фрагмента увеличивается в 5,6 раза, а для Fab-фрагмента — уменьшается в 3,2 раза (табл. 2). Это приводит к тому, что в данном интервале рН аффинность связывания с Гсфрагментом возрастает, а с Fab-фрагментом – уменьшается (рис. 6, а). Полученные данные коррелируют с результатами ДРС, согласно которым шаперонная активность rSkp при pH 6,7 выше по отношению к Fc-фрагменту, чем к Fabфрагменту IgG (рис. 3,  $\partial$ ). Возможно, различия между Fc- и Fab-фрагментами при взаимодействии с rSkp объясняются тем, что изоэлектрические точки этих белков находятся в области рН 6,0-7,4, и при этом Fc-фрагмент имеет более низкое значение рI, чем Fab-фрагмент [40]. В случае IgG характер зависимости величин констант диссоциации от рН в интервале 6,0-7,4 для сайта с К<sub>D</sub>1 подобен таковому для Fc-фрагмента, а для сайта с K<sub>D</sub>2 совпадает с таковым для Fabфрагмента (рис. 6, б). Это позволяет предполагать, что  $K_D1$  и  $K_D2$  относятся к связыванию rSkp с Fc- и Fab-фрагментами (соответственно) на иммобилизованном IgG человека.

При увеличении рН среды от 7,4 до 8,0 аффинность взаимодействия rSkp с Fc-фрагментом остается неизменной, а с Fab-фрагментом — увеличивается (рис. 6, a, табл. 2). Эти результаты плохо соответствуют данным ДРС, согласно которым rSkp имеет самую низкую шаперонную активность при рН 7,9 (рис. 3, e). Возможно, это является результатом занижения значений  $K_D$  за счет быстрой самоассоциации rSkp в качестве аналита в щелочной среде вблизи изоэлектрической точки (табл. 1). Подобное кажущееся увеличение аффинности, наблюдаемое методом ППР, с ростом размеров агрегатов, участвующих в реакции лиганд-рецепторного взаимодействия, ранее

было описано в литературе [41]. На молекуле IgG при pH 8,0 в сравнении с другими значениями pH оба сайта связывания демонстрируют самую низкую аффинность взаимодействия (рис. 6,  $\delta$ ; табл. 2), что хорошо согласуется с проявлением rSkp низкой шаперонной активности, наблюдаемой методом ДРС при pH 7,9 (рис. 3, e). Однако это не исключает того, что значения  $K_D$  могут быть занижены по причине самоассоциации rSkp.

Проведенное исследование показало, что в интервале рН 5,0-8,0 максимальную иммуноглобулинсвязывающую и шаперонную активности rSkp *Y. pseudotuberculosis* проявляет в растворе с кислым значением рН, при котором он наиболее стабилен. По мере увеличения рН среды наблюдается медленная самоассоциация и агрегация шаперона, а также заметное снижение его связывающих свойств.

Полученная информация может представлять практический интерес в связи с тем, что иммуноглобулины широко используются в медицине в качестве эффективных терапевтических препаратов для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, рака и других патологий. Агрегаты IgG, которые образуются при длительном хранении, увеличивают иммуногенность препаратов, а также изменяют их физические свойства, в первую очередь вязкость. Контроль над агрегацией является ключом к производству качественных и стабильных биофармацевтических препаратов.

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holck, A., Lossius, I., Aasland, R., Haarr, L., and Kleppe, K. (1987) DNA- and RNA-binding proteins of chromatin from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, 908, 188–199, doi: 10.1016/0167-4781(87)90058-3.
- Holck, A., and Kleppe, K. (1988) Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17K protein of *Escherichia coli*, *Gene*, 67, 117–124, doi: 10.1016/0378-1119(88)90014-5.
- Koski, P., Rhen, M., Kantele, J., and Vaara, M. (1989) Isolation, cloning, and primary structure of a cationic 16kDa outer membrane protein of Salmonella typhimurium, J. Biol. Chem., 264, 18973–18980.
- 4. Koski, P., Hirvas, L., and Vaara, M. (1990) Complete sequence of the *ompH* gene encoding the 16-kDa cationic outer membrane protein of *Salmonella typhimurium*, *Gene*, **88**, 117–120, doi: 10.1016/0378-1119(90)90068-3.
- De Cock, Y., Schafer, U., Potgeter, M., Demel, R., Muller, M., and Tommassen, J. (1999) Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysacharides and nonnative outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein, *Eur. J. Biochem.*, 259, 96–103, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00010.x.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J., and de Cock, H. (2001) The early interaction of the outer membrane protein PhoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at cytoplasmic membrane, *J. Biol. Chem.*, 276, 18804–18811, doi: 10.1074/jbc. M011194200.
- Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю. (2012) Биогенез β-баррельных интегральных белков наружной мембраны бактерий, *Биохимия*, 77, 1459—1477.
- 8. Entzminger, K.C., Chang, C., Myhre, R.O., McCallum, K.C., and Maynard, J.A. (2012) The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation, *Biochemistry*, **51**, 4822–4834, doi: 10.1021/bi300412y.
- 9. Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2007) Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 563–565, doi: 10.1038/nbt1296.
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2001) Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones protein expression and purification, *Protein Expr. Purif.*, 23, 338–347, doi: 10.1006/prep.2001.1520.
- Sonoda, H., Kumada, Y., Katsuda, T., and Yamaji, H. (2011) Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 465–470, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.015.
- Geyer, R., Galanos, C., Westphal, O., and Golecki, J. (1979)
   A lipopolysaccharide-binding cell-surface protein from *Salmonella minnesota*. Isolation, partial characterization and occurrence in different Enterobacteriaceae, *Eur. J. Biochem.*, 98, 27–38, doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13156.x.
- 13. Holck, A., Lossius, I., Aasland, R., and Kleppe, K. (1987) Purification and characterization of the 17 K protein, a DNA-binding protein from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **914**, 49–54, doi: 10.1016/0167-4838(87)90160-9.
- Shrestha, A., Shi, L., Tanase, S., Tsukamoto, M., Nishino, N., Tokita, K., and Yamamoto, T. (2004) Bacterial chaperone protein, Skp, induces leukocyte chemotaxis via C5a receptor, *Am. J. Pathol.*, 164, 763–772, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63164-1.
- Vuorio, R., Hirvas, L., Raybourne, R.B., Yu, D.T.Y., and Vaara, M. (1991) The nucleotide and deduced amino acid sequence of the cationic 19 kDa outer membrane protein OmpH of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Biochim. Biophys.* Acta, 1129, 124–126, doi: 10.1016/0167-4781(91)90226-C.

- Lahesmaa, R., Skurnik, M., Vaara, M., Leirisalo-Repo, M., Nissila, M., Granfors, K., and Toivanen, P. (1991) Molecular mimickry between HLA B27 and *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Klebsiella* within the same region of HLA α<sub>1</sub>-helix, *Clin. Exp. Immunol.*, 86, 399–404, doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb02944.x.
- 17. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. (2009) Белок шаперон Skp из *Yersinia* pseudotuberculosis обладает способностью связывать иммуноглобулины G, Биохимия, 74, 501–514.
- 18. Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренок П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. (2012) Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*, *Биохимия*, 77, 1571–1583.
- 19. Сидорин Е.В., Сидорова О.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. (2015) Шаперонная активность иммуноглобулинсвязывающего белка *Yersinia pseudotuberculosis*, *Биол. мембр.*, **32**, 217—220, doi: 10.7868/S0233475515030081.
- 20. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
- Ioannou, J.C., Donald, A.M., and Tromp, R.H. (2015) Characterizing the secondary structure changes occurring in high density systems of BLG dissolved in aqueous pH 3 buffer, *Food Hydrocolloids*, 46, 216–225, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.027.
- 23. Walton, T.A., and Sousa, M.C. (2004) Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation, *Mol. Cell*, **15**, 367–374, doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.023.
- Hawea, A., Kasperb, J.C., Friessb, W., and Jiskoot, W. (2009) Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze—thawing and thermal stress, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 38, 79–87, doi: 10.1016/j.ejps.2009.06.001.
- 25. Arosio, P., Barolo, G., Muller-Spath, T., Wu, H., and Morbidelli, M. (2011) Aggregation stability of a monoclonal antibody during downstream processing, *Pharm. Res.* 28, 1884–1894. doi: 10.1007/s11095-011-0416-7.
- Res., 28, 1884–1894, doi: 10.1007/s11095-011-0416-7.
  26. Amani, S., Nasim, F., Khan, T.A., Fazili, N.A., Furkan, M., Bhat, I.A., Khan, J.M., Khan, R.H., and Naeem, A. (2014) Detergent induces the formation of IgG aggregates: a multimethodological approach, Spectrochimica Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 120, 151–160, doi: 10.1016/j.saa.2013.09.141.
- 27. Esfandiary, R., Parupudi, A., Casas-Finet, J., Gadre, D., and Sathish, H. (2015) Mechanism of reversible self-association of a monoclonal antibody: role of electrostatic and hydrophobic interactions, *J. Pharm. Sci.*, **104**, 577–586, doi: 10.1002/jps.24237.
- Nezlin, R. (2010) Interactions between immunoglobulin G molecules, *Immunol. Lett.*, 132, 1–5, doi: 10.1016/j.imlet. 2010.06.006.
- 29. Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., and Narhi, L.O. (2011) Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates, *J. Biol. Chem.*, **286**, 25118–25133, doi: 10.1074/jbc.M110.160457.
- Luo, Q., Joubert, M.K., Stevenson, R., Ketchem, R.R., Narhi, L.O., and Wypych, J. (2011) Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions, *J. Biol. Chem.*, 286, 25134–25144, doi: 10.1074/jbc.M110.160440.

- 31. Wang, W. (2005) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Intern. J. Pharm.*, **289**, 1–30, doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.11.014.
- Arosio, P., Rima, S., and Morbidelli, M. (2013) Aggregation mechanism of an IgG2 and two IgG1 monoclonal antibodies at low pH: from oligomers to larger aggregates, *Pharm. Res.*, 30, 641–654, doi: 10.1007/ s11095-012-0885-3.
- 33. Gil, D., and Schrum, A.G. (2013) Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **4**, 73–84, doi: 10.4236/abb.2013.44A011.
- 34. Roberts, C.J. (2014) Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control, *Trends Biotechnol.*, **32**, 372–380, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005.
- Poon, S., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Pankhurst, G.J., and Wilson, M.R. (2002) Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin, *J. Biol. Chem.*, 277, 39532–39540, doi: 10.1074/jbc.M204855200.
- 36. Tapley, T.L., Franzmann, T.M., Chakraborty, S., Jakob, U., and Bardwell, J.C.A. (2010) Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1071–1076, doi: 10.1073/pnas.0911610107.

- Bose, D., Patra, M., and Chakrabarti, A. (2017) Effect of pH on stability, conformation, and chaperone activity of erythroid & non-erythroid spectrin, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, 1865, 694–702, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.03.012.
- 38. Malki, A., Le, H.-T., Milles, S., Kern, R., Caldas, T., Abdallah, J., and Richarme, G. (2008) Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB, *J. Biol. Chem.*, **283**, 13679 –13687, doi: 10.1074/jbc.M800869200.
- Tapleya, T.L., Korner, J.L., Bargea, M.T., Hupfelda, J., Schauertec, J.A., Gafnic, A., Jakoba, U., and Bardwella, J.C.A. (2009) Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 5557–5562, doi: 10.1073/pnas. 0811811106.
- Coleman, L., and Mahler, S.M. (2003) Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis, *Protein Expres. Purif.*, 32, 246–251, doi: 10.1016/j.pep.2003.07.005.
- 41. Luo, Y., Lu, Z., Raso, S.W., Entrican, C., and Tangarone, B. (2009) Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher *in vitro* binding affinities to Fcγ receptors, *mAbs*, 1, 491–504.

## THE CHAPERONE AND IMMUNOGLOBULIN-BINDING ACTIVITIES OF Skp PROTEIN FROM Yersinia pseudotuberculosis\*

E. V. Sidorin\*\*, V. A. Khomenko, N. Yu. Kim, and T. F. Solov'eva

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 690022 Vladivostok, Russia; E-mail: sev1972@mail.ru

Received May 20, 2019 Revised August 20, 2019 Accepted September 10, 2019

Here, we determined qualitative and quantitative characteristics of the chaperone and immunoglobulin-binding activities of recombinant Skp protein (rSkp) from *Yersinia pseudotuberculosis* using the methods of dynamic light scattering and surface plasmon resonance. Commercial human polyclonal IgG and Fc and Fab fragments of human IgG were used as substrate proteins. The activity of rSkp strongly depended on the medium pH. The most stable low-molecular-weight complexes with a hydrodynamic radius up to 10 nm were formed by rSkp and protein substrates at acidic pH values. Under these conditions, rSkp exhibited the lowest propensity to self-association and the highest affinity for human IgG and its Fc and Fab fragments, as well as prevented their aggregation most efficiently (i.e., demonstrated the maximal chaperone activity). As the medium pH increased, the affinity of rSkp for IgG and its fragments decreased; rSkp was not able to completely prevent the aggregation of protein substrates, but significantly slowed it down. The obtained information may be of practical interest, since the stability of therapeutic IgG preparations affects their safety and efficacy in medical applications.

Keywords: Skp chaperone, Yersinia pseudotuberculosis, human immunoglobulin G, Fc and Fab fragments of IgG, protein—protein interactions, dynamic light scattering, surface plasmon resonance

УДК 577.22; 577.322.2

# ПРОВЕРКА ПОДХОДА К СОЗДАНИЮ СТАБИЛЬНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ, ОСНОВАННОГО НА ПРЕДСКАЗАНИИ НАТИВНО-РАЗВЕРНУТЫХ УЧАСТКОВ, НА ПРИМЕРЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ L1\*

© 2020 Г.С. Нагибина\*\*, В.В. Марченков, К.А. Глухова, Т.Н. Мельник, Б.С. Мельник

Институт белка РАН, 142290, Пущино Московская обл., Россия; электронная почта: galina-nagibina@phys.protres.ru

Поступила в редакцию 09.08.2019 После доработки 27.09.2019 Принята к публикации 27.09.2019

В наших предыдущих работах была высказана идея о том, что для поиска ослабленных участков в белке можно использовать программы, предсказывающие нативно-развернутые участки по аминокислотной последовательности. Участки, предсказанные такими программами, являются подходящими мишенями для введения мутаций, стабилизирующих белок. Однако при исследовании каждого конкретного белка остается непонятным, что является определяющим для стабилизации - аминокислотная последовательность (и, соответственно, предсказание ослабленности) или пространственная структура белка. Чтобы это выяснить, необходимо исследовать два белка, одинаковых по структуре, но отличающихся по аминокислотной последовательности и, соответственно, с разным предсказанием ослабленности. Введение одинаковых мутаций в одинаковые структурные элементы в разных белках поможет экспериментально выяснить, что является определяющим фактором для повышения стабильности белка – предсказания ослабленности или пространственная упаковка белка. Для таких исследований мы выбрали рибосомные белки L1 из галофильной археи Haloarcula marismortui (HmaL1) и L1 из экстремофильной бактерии Aquifex aeolicus (AaeL1). Эти белки одинаковы по структуре, но различны по аминокислотной последовательности. Показано, что дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как структурированный в белке АаеL1, не привела к повышению температуры плавления белка. В то же время дисульфидная связь, введенная в такой же структурный элемент, но предсказанный как ослабленный участок в белке HmaL1, привела к повышению температуры плавления приблизительно на 10 градусов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибосомный белок L1, стабилизация глобулярных белков, нативно-развернутые участки белков, дисульфидные связи.

DOI: 10.31857/S032097252001008X

В середине прошлого века были открыты белки, не имеющие фиксированной третичной структуры — так называемые «неупорядоченные» белки [1]. Активное изучение таких белков началось в конце 1990-х гг. Последние несколько лет исследованию таких белков было посвящено большое количество работ [2, 3]. Интерес к нативно-развернутым белкам инициировал активное развитие теоретических программ, позволяющих предсказывать по аминокислотной последовательности, к какому из классов относится белок: к полностью структурированным или к нативно-развернутым [2, 3]. Такие программы основаны на совершенно разных тео-

ретических подходах (например, нейронные сети — DISOPRED [4] или подсчет статистики встречаемости отдельных аминокислотных остатков в разных белках в участках, которые не детектируются методом рентгеноструктурного анализа — DisEMBL [5]). Также существуют программы, объединяющие в себе несколько разных подходов, так называемые метапредикторы: PONDR-FIT [6].

Оказалось, что, несмотря на различия в теоретических подходах, результаты предсказаний разных программ довольно хорошо согласуются. Более того, по расчетам таких программ видно, что практически в любом плотно упакованном белке есть небольшие участки полипептидной цепи, которые предсказываются как нативно-развернутые, хотя по своей структуре они плотно упакованы, структурированы и ничем особо не отличаются от других участков исследованных белков [7]. Мы предположили, что реа-

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-242, 02.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

лизованные в этих программах алгоритмы позволяют предсказать не только нативно-развернутые участки (подвижные и неструктурированные), но и участки, не способные к самостоятельному приобретению жесткой упаковки. В нашей предыдущей работе мы проверили идею, что именно такие участки могут являться «целью» для введения стабилизирующих структуру мутаций, а именно искусственных дисульфидных связей, введенных на поверхности белка [8]. Нашей целью была стабилизация белка Gao из Drosophila melanogaster, который долгое время не удавалось закристаллизовать. Мы предположили, что проблема заключается в подвижности и нестабильности отдельных участков полипептидной цепи этого белка. Аминокислотная последовательность белка Gαо была проанализирована с помощью программ PONDR-FIT и isUnstruct [6, 9]. Один из участков структуры этого белка был предсказан как нативно-развернутый. В этом участке нами была спроектирована дисульфидная связь, которая привела к стабилизации структуры белка Gαо на 4 градуса при тепловой денатурации [8]. Эта работа показала, что для поиска ослабленных участков в белках действительно можно использовать программы, предсказывающие нативноразвернутые участки полипептидной цепи.

Для более детальной проверки этой идеи необходимо убедиться, что основным параметром, влияющим на стабилизацию белка при введении мутации, является именно предсказанная ослабленность участка полипептидной цепи, а не особенности вторичной или третичной структуры белка.

Для этого необходимо исследовать два белка одинаковых по структуре, но достаточно сильно отличающихся по аминокислотной последовательности.

Такими объектами были выбраны рибосомные белки L1 из галофильной археи Haloarcula marismortui (HmaL1) и L1 из экстремофильной бактерии Aquifex aeolicus (AaeL1). Структура AaeL1 известна [10], для белка HmaL1 структура была смоделирована [11]. Оба эти белка имеют характерную для рибосомных белков L1 структуру, в которой можно выделить два домена, соединенные двухтяжевой междоменной перетяжкой. *N*- и *C*-концы белка располагаются в домене I, который отвечает за связывание 23S pPHK. Домен II участвует в процессе узнавания рРНК [11]. Особенность этих белков заключается в том, что они различаются по своей аминокислотной последовательности (идентичность 33%), но схожи по пространственной структуре. Именно поэтому мы остановили свой выбор на рибосомных белках L1, структура которых высоко консервативна. К сожалению, достаточно отличающаяся аминокислотная последовательность, у которой достоверно различаются предсказания нативно-развернутых участков, оказалась только у белков, «приспособленных» к функционированию в разных условиях. Поскольку в данной работе не стояла задача сравнить между собой белки L1 из разных организмов, нам нужно сравнить белок дикого типа и мутантный, т.е. понять тенденцию, как повлияли дисульфидные связи, введенные в одинаковые участки структуры белка, но с разными предсказаниями нативно-развернутости, на стабильность белков. Безусловно, сравнение в каждой паре белков проводилось в одинаковых условиях.

Далее мы остановимся на анализе домена II этих белков, поскольку предсказания нативноразвернутости этого домена отличаются для двух исследуемых белков: в белке HmaL1 домен II предсказывается как нативно-развернутый, а в белке AaeL1 – как частично структурированный. Поэтому дизайн мутаций во втором домене белков L1 позволит сравнить влияние введения дисульфидных связей в одинаковых структурных элементах на белки с одинаковой структурой, но с разным аминокислотным составом, и потому с разной предрасположенностью быть нативно-развернутыми. Такие исследования позволят нам проверить предположение о том, что для дизайна мутаций, повышающих стабильность белков, можно использовать теоретические подходы, предсказывающие нативноразвернутые участки белков.

Наши предположения полностью подтвердились. Дисульфидная связь, введенная в HmaL1 на участке аминокислотной последовательности, предсказанной как нативно-развернутый, привела к повышению стабильности белка. Дисульфидная связь, введенная в такой же по структуре, но предсказанный как структурированный участок белка AaeL1, не повлияла на стабильность белка.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическую конструкцию, содержащую ген белка AaeL1 (рЕТ11а-PL-AaeL1) экспрессировали в штамме-суперпродуценте *Escherichia coli* BL21 (DE3). Плазмида с геном мутантной формы белка AaeL1 была сконструирована на основе вектора рЕТ11а-PL-AaeL1 («Novagen», США) и пары праймеров («Евроген», Россия), указанных в таблице, методом сайт-направленного мутагенеза с использованием полимеразы КОD Hot Start DNA Polymerase («Novagen», США) в

соответствии с инструкцией производителя. Последовательность конструкций проверяли секвенированием («Евроген», Россия). Белки AaeL1 и AaeL1-D101C-K127С были получены как описано Nikonova et al. [10]. Плазмида мутантной формы белка HmaL1-E82C-D114C была сконструирована на основе плазмиды рЕТ11а-PL-HmaL1 («Novagen», США), несущей ген белка дикого типа, по стандартной ПЦР-методике с использованием вектора pET11a-PL в качестве матрицы. Для увеличения эффективности выделения и очистки белка в генетическую конструкцию была добавлена гексогистидиновая последовательность, располагающаяся на С-конце белка. Для этого фрагмент ДНК, кодирующий гексогистидиновую последовательность, был получен путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции NdeI и XbaI («Thermo», США) из плазмиды pET19mod («Novagen», США) и субклонирован в вектор рЕТ11а-PL-HmaL1-E82C-D114C [12]. Соответствие последовательностей белков проверяли секвенированием. Клетки *E. coli* штамма Rosetta (DE3) («Novagen», США) трансформировали плазмидами, содержащими ген белка HmaL1, и высевали на жидкую среду LB («Amresco», США). Биомассу выращивали («Eppendorf», Германия) при температуре 37 °C и хорошей аэрации до поглощения ( $A_{600\text{hm}}$ ) 0,8-1,0, после чего добавляли индуктор экспрессии ІРТС до конечной концентрации 1 мМ. Клеточную культуру растили при 37 °С до поглощения ( $A_{600\text{нм}}$ ) 1,8—2,0. Экспрессию гена проверяли при помощи электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН. Клетки, осажденные центрифугированием (8000 g, 15 мин) («Hermle», Германия), растворяли в буфере (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 M LiCl, 100 мМ имидазол, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF) («Sigma», Германия). Биомассу подвергали разрушению с помощью гомогенизатора высокого давления EmulsiFlex-C3 («Avestin», Канада) и затем центрифугировали («Beckman», США) 40 мин при 90 000 g и 4 °С. Белок, меченый гексогистидиновой последовательностью, очищали путем аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP (5 мл) («GE Healthcare», США), уравновешенной буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 M NaCl, 20 мМ имидазол и 50 мМ MgCl<sub>2</sub>. Элюцию проводили градиентом буфера 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 M NaCl, 200 мМ имидазол, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>. Фракции, содержащие HmaL1, собирали и концентрировали для дальнейшей очистки. Гель-фильтрацию проводили на колонке HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade («GE Healthcare», США), уравновешенной 50 MM Tris-HCl pH 7,5; 3 M NaCl, 50 MM MgCl<sub>2</sub>, 500 мМ NH<sub>4</sub>Cl. Чистоту препарата оценивали с помощью электрофореза по Лэммли [13]. Очищенный белок концентрировали и хранили при 4 °С. Аналогичным образом проводили выделение и очистку мутантной формы белка HmaL1-Е82С-D114С, добавляя 5 мМ β-меркаптоэтанола для предупреждения образования межмолекулярных дисульфидных связей.

Окисление свободных SH-групп. Окисление свободных SH-групп в мутантной форме белка AaeL1-D101C-K127С происходило спонтанно в растворе. Для окисления свободных SH-групп в мутантной форме белка HmaL1-E82C-D114C использовали буфер, содержащий 200 мМ Tris-HCl pH 8,8; 2 M NaCl, 50 MM MgCl<sub>2</sub>, 500 MM NH<sub>4</sub>Cl и 1 мМ EDTA. Окисление белка проводили в присутствии окисленного и восстановленного глутатионов в конечной концентрации 10 мМ и 2 мМ соответственно. Инкубацию проводили при комнатной температуре 24 ч. После инкубации осуществляли перевод белка в буфер, содержащий 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3M NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub> и 500 мМ NH<sub>4</sub>Cl. Проверку формирования цистеиновых мостиков в мутантных формах белков проводили методом электрофореза по Лэммли с некоторой модификацией:

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров		
AaeL1_Asp101CysF	ACTACGTAGGCGGCTGCGAACTCATAAACAA		
AaeL1_Asp101CysR	TTGTTTATGAGTTCGCAGCCGCCTACGTAGT		
AaeL1_Lys127CysF	GGAGATGATGCCATGTTGCAAAACTTG		
AaeL1_Lys127CysR	CAAGTTTTGCAACACATGGCATCATCTCC		
HmaL1_Glu82CysF	GACGTACTCGACTGCGATGAACTCGAAGAA		
HmaL1_Glu82CysR	TTCCTCGAGTTCATCGCAGTCGAGTACGTC		
HmaL1_Asp114CysF	GGACTGATGCAGTGCATCGGTCGCTAC		
HmaL1_Asp114CysR	CTAGCGACCGATGCACTGCATCAGTCC		

наличие в белках дисульфидных связей контролировали добавлением β-меркаптоэтанола.

Концентрацию белка AaeL1 определяли по поглощению при 280 нм с коэффициентом экстинкции  $A_{\rm Imf/MJ}^{\rm lcm} = 0,59$  [10]. Коэффициент экстинкции для HmaL1 ( $A_{\rm Imf/MJ}^{\rm lcm} = 0,176$ ) был определен расчетным способом, используя программу Vector-NTI.

Измерения собственной флуоресценции белков проводили на спектрофлуориметре Varian Cary 100 («Varian», Австралия) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Длина волны возбуждающего света составляла 280 нм, регистрацию спектров испускания флуоресценции проводили в интервале 290—500 нм. Исследования проводили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5 в присутствии 4 М мочевины, в диапазоне температур 21—98 °С. Рабочая концентрация белка составляла 0,2 мг/мл.

Эксперименты с белками AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C проводили с помощью дифференциального сканирующего микрокалориметра («СКАЛ-1», Россия) со стеклянной ячейкой объемом 0,33 мл при скорости нагрева 1 °С/мин (1,0 К/мин) и под давлением 2,5 атм [14]. Образцы переводили в соответствующий буферный раствор (20 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,5; 4 М мочевины) путем продолжительного диализа. Концентрации белков в экспериментах (1,0 мг/мл) измеряли спектрофотометрически («Экром», Россия). Для записи данных использовали программу SCAL («СКАЛ», Россия). Зависимость молярной теплоемкости от температуры рассчитывали стандартным способом [15] и в дальнейшем анализировали с использованием программы SigmaPlot («SigmaPlot», США).

Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли на спектрополяриметре Chirascan («Applied Photophysics», Англия). Для измерений КД в дальней ультрафиолетовой области использовали кюветы с длиной оптического пути 0,1 см. Концентрация белка для измерений спектров дальнего КД составляла 0,2 мг/мл для AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C и 0,4 мг/мл для HmaL1 и HmaL1-E82C-D114C. Спектры регистрировали в интервале длин волн 200—250 нм.

Значения молярной эллиптичности рассчитывали по уравнению:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{\tiny M3M}} \times M/(L \times C),$$

где С — концентрация белка (мг/мл), L — длина оптического пути кюветы (мм),  $[\theta]_{\text{изм}}$  — измеренная эллиптичность (градусы) и М — средняя молекулярная масса белка (Да). Зависимость эл-

липтичности от температуры при 215 нм измеряли со скоростью нагрева 1 °С/мин. Исследования AaeL1 и AaeL1-D101C-K127С проводили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере при рН 7,5 в присутствии 4 М мочевины. Исследования HmaL1 и HmaL1-E82C-D114С проводили в 50 мМ Tris-HCl рН 7,5; 3 M NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl.

Фрагмент 23S рРНК *H. marismortui* (спирали 76—78) был любезно предоставлен С.В. Тищенко (ИБ РАН, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции). Последовательность фрагмента: ggGUCGCCGAUGUGCA-GCAUAGGUAGGAGACACUACACAGGUACC-CGCGCUAGCGGGCCACCGAGUCAACAGU-GAAAUACUACCCGUCGGUGACcc.

Для формирования РНК—белкового комплекса раствор с фрагментом рРНК инкубировали при 70 °С в течение 10 мин, затем охлаждали на льду. Далее к раствору рРНК добавляли белок, диализованный против буфера для связывания (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 M NaCl, 500 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>) в молярном соотношении рРНК/белок — 1/1. Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре 30 мин.

Для оценки образования комплекса pPHK/белок *in vitro* мы использовали эксклюзионную хроматографию. Для анализа мы использовали хроматографическую систему Varian ProStar HPLC («Varian», Австралия) с колонкой для гельфильтрации Superdex 200 (24 мл) («GE Healthcare», США), предварительно уравновешенной буфером 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 500 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>. Препарат pPHK/белок (0,2 мг/мл, pPHK/белок в молярном соотношении 1/1, v = 200 мкл) наносили на колонку и элюировали со скоростью 0,4 мл/мин. Калибровочную кривую строили с использованием белков БСА, овальбумин, рибонуклеаза и апротинин («Вio-Rad», США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение пространственной структуры и аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1. Пространственная структура рибосомных белков L1 отличается высокой консервативностью: в ней можно выделить два домена (I и II), которые соединены гибкой перетяжкой, позволяющей им менять взаимное расположение. Известно два варианта взаимного расположения доменов в растворе: «открытое» и «закрытое» [10]. «Открытая» конформация характерна для архейных белков L1 (к ним относится HmaL1) и подразумевает такое расположение доменов друг относительно друга, при

biokhsm/

котором РНК-связывающие участки открыты и доступны для РНК. «Закрытая» конформация — это такое расположение доменов, когда они сближены, а РНК-связывающие участки скрыты. Такая конформация присуща бактериальным белкам L1 и была обнаружена у белка AaeL1 [10].

На рис. 1, а представлено наложение пространственной структуры белка AaeL1 (синим) и модели пространственной структуры белка HmaL1 (зеленым). Оба белка имеют характерную для белков L1 двухдоменную структуру: N- и *С*-концы расположены в домене I, который связан двухцепочечной перетяжкой с доменом II. Видно, что основные элементы вторичной структуры домена І двух белков (четырехтяжевой антипараллельный β-слой, закрытый с одной стороны двумя α- спиралями) хорошо накладываются друг на друга, за исключением C-концевой α-спирали в домене I белка AaeL1. При сравнении структур двух белков видно характерное различие архейных и бактериальных белков L1, заключающееся в разном повороте домена II относительно домена I. Однако если отдельно сравнить структуры доменов II, мы также увидим их хорошее наложение (рис.  $1, \delta$ ). Видно, что оба этих домена имеют топологию укладки по Россману [16], когда параллельный четырехтяжевой  $\beta$ -слой закрыт двумя  $\alpha$ -спиралями с одной стороны и четырьмя  $\alpha$ -спиралями с другой.

Сравнение аминокислотных последовательностей белков, выполненное в программе BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), показало, что идентичность аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1 составляет 33%. На рис. 2 показано выравнивание аминокислотных последовательностей двух белков, серым цветом показаны идентичные аминокислотные остатки. Белки AaeL1 и HmaL1 отличаются по своей длине: AaeL1 состоит из 242 a.o., белок HmaL1 – из 212 a.o. Интересно, что белок HmaL1 имеет в своей последовательности ~1/4 отрицательно заряженных а.о. (аспартат и глутамат), располагающихся в основном на поверхности домена II, что является нехарактерным для белков L1 из других организмов [11].

Поиск неупорядоченных участков и дизайн дисульфидных связей в белках AaeL1 и HmaL1. Поиск неупорядоченных участков в последовательностях белков проводился с помощью про-

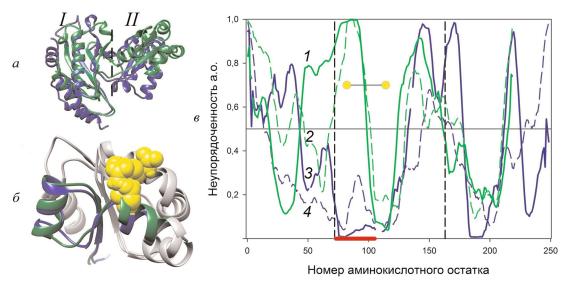


Рис. 1. Сравнение пространственной структуры и аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1. *а* — Наложение пространственной структуры белка AaeL1 (PDB:3QOY) (синим) и модели пространственной структуры HmaL1 (зеленым). Пунктирной линией разделены домены I и II. *б* — Наложение пространственных структур доменов II белка AaeL1 и HmaL1. Синим цветом окрашен участок полипептидной цепи белка AaeL1, предсказанный программами PONDR-FIT и IsUnstruct как структурированный. Зеленым цветом окрашен участок полипептидной цепи белка HmaL1, предсказанный как неупорядоченный. Желтым цветом и объемом выделены аминокислотные остатки, выбранные нами для замены на остатки цистеинов. *в* — Вероятность аминокислотных остатков в белках HmaL1 (зеленые линии *I* и *2*) и AaeL1 (синие линии *3* и *4*) быть неупорядоченными (в нативно-развернутом состоянии), выполненные с помощью программ PONDR-FIT (сплошными линиями) и IsUnscruct (пунктирными линиями). Вертикальными линиями выделены участки аминокислотных последовательностей белков, образующие домен II. Красной линией внизу графика показан участок аминокислотной последовательности, в котором предсказания неупорядоченности участков для белков AaeL1 и HmaL1 различаются. Желтыми кружками показаны позиции для введения дисульфидных связей. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/

БИОХИМИЯ том 85 вып. 1 2020

HmaL1	12	RALEDAPERNFRETVDLAVNLRDLDLNDPSNRVDESVVLPAGTGQETTIVVFAEGETALR	71	
AaeL1	31	KKMEEVLQRRFDETVELAMRL-NVDPRYADQMVRGSVVLPHGLGKPIKVVVFAEGEYAKK	89	
HmaL1	72	${\tt AEEVADDVLDEDELEELGGDDDAAKDLADDTDFFIAEKGLMQDIGRYLGTVLGPRGKMPE}$	131	
AaeL1	90	AEEAGADYVGGDELINKILKEEWTDFDVAIATPEMMPKVAK-LGRILGPRGLMPS	143	
HmaL1	132	PLDPDDDVVEVIERMK-NTVQLRSGERRTFHTRVGAEDMSAENIADNIDVILRR	184	
AaeL1	144	KTGTVTTNVEQAIKDAKRGRVEFKVDKAGNVHMPVGKISFEKEKLIDNLYAAIDAVV-R 2		
HmaL1	185	LHADLEKGPLNIDTVYVKTTMGPAMEV 211		
AaeL1	203	AKPPGAKGQY-IKNMAVSLTMSPSVKL 228		

**Рис. 2.** Сравнение аминокислотных последовательностей рибосомных белков HmaL1 и AaeL1. Идентичные остатки выделены серым цветом

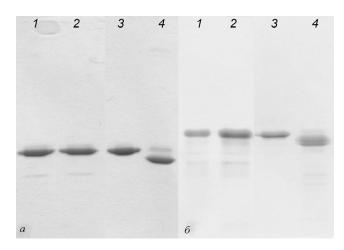
грамм PONDR-FIT и IsUnstruct [6, 9]. На рис. 1, в показана вероятность разных аминокислотных остатков белков AaeL1 (синим цветом) и HmaL1 (зеленым цветом) быть в нативно-развернутом состоянии. Данные получены программами PONDR-FIT (сплошной линией) и IsUnstruct (пунктирной линией). Вертикальными линиями выделен участок аминокислотной последовательности, относящийся к домену II этих белков. В этом домене мы видим большую разницу в предсказаниях программ (участок выделен красным отрезком внизу графика). Для белка AaeL1 этот участок предсказывается как стабильный, в то время как для белка HmaL1 этот участок предсказывается как неупорядоченный. Именно такой участок подходит для проверки нашей идеи. Если результат работы программ типа PONDR-FIT и IsUnstruct действительно можно интерпретировать как предсказание стабильных и ослабленных частей полипептидной цепи белка, тогда введение дисульфидной связи в участок, предсказанный как неупорядоченный, найденный в HmaL1, приведет к повышению стабильности и уменьшению подвижности этого белка, а введение дисульфидной связи в такой же участок, но предсказанный как структурированный в AaeL1, не изменит стабильность белка или даже уменьшит ее. Если более важным для стабилизации белка является его пространственная структура, то введенные мутации одинаковым образом должны повлиять на оба белка.

Дополнительно мы проверили, насколько сам факт замен а.о. в позициях D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1 повлияет на предсказания программ PONDR-FIT и IsUnstruct. Незначительные изменения в аминокислотной последовательности белков (замена двух а.о.) слабо влияют на кривые, показанные на рис. 1, в. По крайней мере это влияние мень-

ше, чем отличия между предсказаниями программ PONDR-FIT и IsUnstruct.

На рис. 1,  $\delta$  показано наложение пространственных структур доменов II белков AaeL1 и HmaL1. В них синим и зеленым цветами соответственно показаны участки аминокислотных последовательностей белков, выбранных нами для введения дисульфидных связей, исходя из предсказаний, выполненных программами PONDR-FIT и IsUnstruct. Желтым цветом и объемом показаны аминокислотные остатки, выбранные нами для замены на остатки цистеинов. Ими оказались D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1. Выбор аминокислотного остатка для замены на остатки цистеинов проводили по двум критериям: расстояние между Сβ-атомами аминокислотных остатков должно быть ~5 Å, и остатки в пространстве должны быть направлены друг на друга.

Формирование дисульфидных связей в мутантных формах белков AaeL1-D101C-K127C и **HmaL1-E82C-D114C.** Мутантные формы белков AaeL1 и HmaL1 были выделены и очищены, как описано в «Методах исследования». Проверку формирования дисульфидных связей в мутантных формах белка проводили методом ПААГ электрофореза в присутствии ДСН. Это возможно благодаря различию гидродинамического радиуса денатурированных белков с завязанной дисульфидной связью и без нее. На рис. 3 показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН для белка AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C (рис. 3, a) и HmaL1 дикого типа и HmaL1-E82C-D114C (рис. 3, б). В условиях, когда SH-группы восстановлены – в присутствии β-меркаптоэтанола (дорожки 1 и 2 на обоих рисунках) белки дикого типа и мутантных форм имеют одинаковую подвижность в геле. В условиях, когда дисульфидные связи завязаны, т.е. в условиях отсутствия β-меркаптоэта-



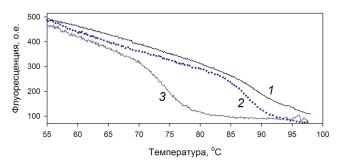
**Рис. 3.** Результаты анализа методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН белков AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C (a), HmaL1 и HmaL1-E82C-D114C ( $\delta$ ): в условиях восстановленных дисульфидных связей (дорожки 1 и 2) и окисленных дисульфидных связей (дорожки 3 и 4)

нола (дорожки 3 и 4 на обоих рисунках) подвижность белков дикого типа и белков с завязанными дисульфидными связями различается. Результаты, показанные на рис. 3, говорят о том, что введенные нами дисульфидные связи спроектированы корректно и завязываются спонтанно в растворе в белке AaeL1-D101C-K127C, а также формируются в процессе окисления в белке HmaL1-E82C-D114C, как описано в «Методах исследования».

Исследование стабильности белка AaeL1 с введенной дисульфидной связью. АаеL1 — белок из термофильной бактерии, его отличает высокая термостабильность. Для того чтобы исследовать процесс его плавления, нам было необходимо немного уменьшить его стабильность, например, присутствием дополнительного денатуранта. На рис. 4 показано плавление белка AaeL1 в присутствии разных концентраций мочевины, исследованное методом флуоресценции. Видно, что в отсутствие денатуранта температура плавления белка находится за пределами 100 °C. В присутствии 1 М мочевины – в районе 90 °C, в присутствии 4 М мочевины – в районе 75 °C. На рис. 5, а серым и черным цветами показаны спектры КД для белка АаеL1 дикого типа в отсутствие денатуранта (кривая 1) и в присутствии 4 М мочевины (кривая 3). Видно, что форма спектров белка в 0 М мочевины и в 4 М мочевины совпадает. Т.е. 4 М мочевины практически не влияют на структуру нативного состояния, но дестабилизируют его при дальнейшем повышении температуры. Поэтому дальнейшие эксперименты с белком AaeL1 мы решили проводить в присутствии 4 М мочевины.

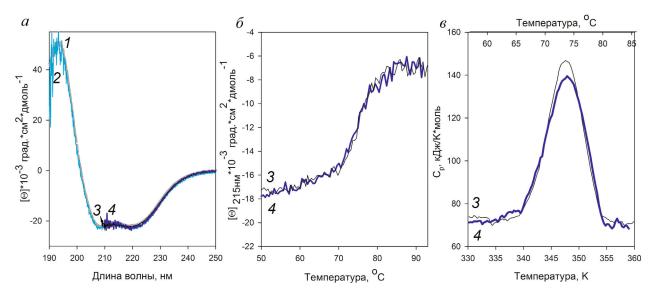
Теперь, когда мы подобрали условия для исследования белка AaeL1, необходимо проверить не нарушила ли дисульфидная связь нативную упаковку белка. На рис. 5, а показаны спектры КД, полученные для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы в отсутствие денатуранта и в присутствии 4 М мочевины. Видно, что в нативных условиях (в отсутствие мочевины) форма спектров белков дикого типа и мутантной формы хорошо совпадает и характерна для α-спиральных белков. В присутствии 4 М мочевины, несмотря на зашумленность, видно, что форма спектров белка дикого типа и мутантной формы совпадают, а также эти спектры совпадают со спектрами белков в нативных условиях. Таким образом, можно сделать вывод, что ни присутствие 4 М мочевины, ни введенная дисульфидная связь не нарушили вторичную структуру в белке.

Процесс плавления белка AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C был исследован методом спектроскопии кругового дихроизма. На рис. 5, б показаны кривые зависимости интенсивности молярной эллиптичности при 215 нм от температуры. Видно, что кривые для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C совпадают. Для уточнения температуры плавления белков AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C мы исследовали процессы плавления этих белков методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рис. 5, в показаны кривые плавления белка AaeL1 и его мутантной формы с введенной дисульфидной связью в присутствии 4 М мочевины. Видно, что для белка дикого типа и для белка с введенной дисульфидной связью температура плавления совпадает и составляет 347К (74 °C).



**Рис. 4.** Изменение интенсивности флуоресценции в процессе тепловой денатурации для белка AaeL1 дикого типа в нативных условиях (*1*), в присутствии 1 М мочевины (*2*) и 4 М мочевины (*3*). Измерения проводились в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



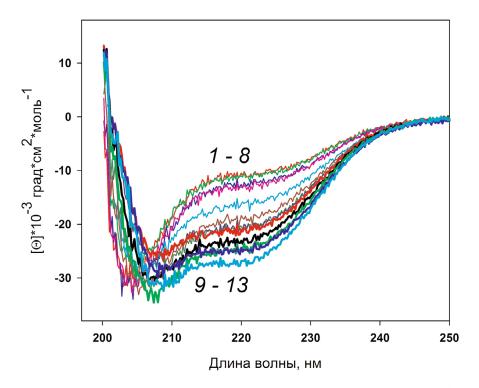
**Рис. 5.** Исследование стабильности белка AaeL1 с введенной дисульфидной связью. a — Спектры кругового дихроизма (КД) белка AaeL1 дикого типа (кривые 1 и 3) и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C (кривые 2 и 4) в присутствии различных концентраций мочевины: 1 и 2 (серым и голубым цветом соответственно) в отсутствие денатуранта, 3 и 4 (черным и синим цветом соответственно) в присутствии 4М мочевины. Измерения проводились в 20мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5. 6 — Температурная зависимость молярной эллиптичности на 215 нм — 3 (черным цветом) для белка AaeL1 дикого типа в присутствии 4М мочевины, 4 (синим цветом) для белка AaeL1-D101C-K127C в присутствии 4М мочевины. 6 — 63 ависимость избыточной теплоемкости белка AaeL1 дикого типа (63, черным цветом) и AaeL1-D101C-K127C с завязанной дисульфидной связью (64, синим цветом) от температуры в присутствии 64 М мочевины. С цветным вариантом рис. 65 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

Исследование стабильности белка HmaL1 с введенной дисульфидной связью. Белок HmaL1 является белком из экстремально галофильного организма, обитающего в условиях высоких концентраций соли, близких к сатурации [17]. Поэтому на начальном этапе работы с данным белком мы подобрали такие условия (концентрация NaCl), в которых белок будет структурированным. На рис. 6 показаны спектры КД, полученные для белка HmaL1 в присутствии различных концентраций NaCl. Видно, что в концентрациях 0-2 M NaCl (кривые 1-8) белок HmaL1 неструктурирован или слабоструктурирован. Наибольшее количество вторичной структуры белок HmaL1 имеет в условиях 3 M NaCl (кривая 13, голубым цветом). Таким образом, была определена минимальная концентрация NaCl (3 M), необходимая для структурированности белка HmaL1.

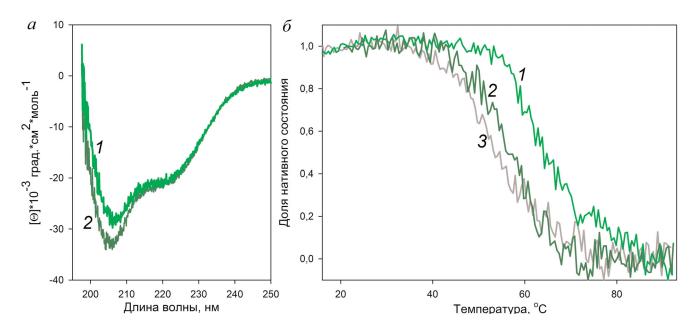
Проектирование дисульфидной связи в белке HmaL1 было основано на модели структуры белка, предложенной в работе Gabdulkhakov et al. [11]. Для корректного завязывания дисульфидных связей в этом белке проводили окисление, как указано в «Методах исследования». Исследование влияния введенной дисульфидной связи на структуру белка HmaL1 проводили с использованием метода спектроскопии КД. На рис. 7, а показаны спектры КД белков

HmaL1 дикого типа и его мутантной формы с завязанной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C. Видно, что дисульфидная связь, введенная в неупорядоченный участок белка, увеличила количество вторичной структуры в белке. Методом спектроскопии КД был исследован процесс плавления белков HmaL1. На рис. 7, б показан график зависимости доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C, рассчитанной интенсивности молярной эллиптичности при 215 нм от температуры. Видно, что белок HmaL1 дикого типа плавится при 55 °C, в то время как белок HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью плавится при 65 °C. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как неупорядоченный (несмотря на то что в структуре этого белка он структурирован), приводит к повышению стабильности белка.

Так как белок HmaL1 является слабоструктурированным и не содержит остатков триптофана в последовательности, а также требует высокой концентрации соли и склонен к агрегации, изучить процесс его плавления методами собственной флуоресценции и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии оказалось не-



**Рис. 6.** Спектры КД белка HmaL1 в присутствии различных концентраций NaCl: от 0 M (кривая *1*) до 3.5 M (кривая *13*) с шагом 0,25 M NaCl. Измерения проводились в буфере 50 мM Tris-HCl, pH 7,5. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



**Рис. 7.** Исследование стабильности белка HmaL1 с введенной дисульфидной связью. a — Спектры КД белка HmaL1 дикого типа (2, темно-зеленым цветом) и HmaL1-E82C-D114C (1, зеленым цветом). Измерения проводились в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 3M NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>.  $\delta$  — Зависимость доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа (2, темно-зеленым цветом), HmaL1-E82C-D114C с завязанной (1, зеленым цветом) и с разорванной (1, серым цветом) дисульфидной связью от температуры. Доля нативного состояния белка рассчитывалась из величины молярной эллиптичности на 215 нм.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

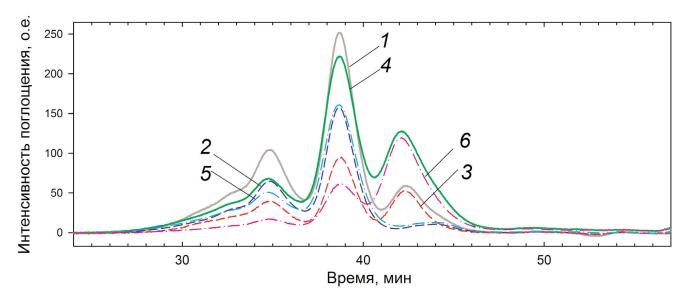


Рис. 8. Профиль элюции HmaL1/23S pPHK (1); HmaL1-E82C-D114C/23S pPHK (4), а также вклад белков HmaL1 (3) и HmaL1-E82C-D114C (6) в комплекс. Кривые 2 и 5 показывают вклад 23S pPHK в комплексы с белком HmaL1 дикого типа и HmaL1 с введенной дисульфидной связью соответственно. С цветным вариантом рис. 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/ biokhsm/

возможным. Мы решили проверить, как повлияла введенная дисульфидная связь на биологическую функцию белка. Белок L1 – высоко консервативный рибосомный белок, который связывается с 23S pPHK. За связывание PHK отвечает домен I белка, домен II, в который мы ввели дисульфидную связь, участвует в процессе узнавания РНК. Исследование комплекса HmaL1/ рРНК мы проводили с использованием гельфильтрационной хроматографии. Связывание белка и рРНК проводили, как описано в «Методах исследования». На рис. 8 показаны профили элюции свободной H77-H78 23S pPHK, комплексов белков HmaL1/H77-H78 23S pPHK и HmaL1-E82C-D114C/H77-H78 23S pPHK, a также показан вклад белка и рРНК в эти комплексы. По высоте пиков на профиле элюции (рис. 8) видно, что 2/3 белка HmaL1 дикого типа связывает РНК, а 1/3 остается свободной. В случае комплекса pPHK с белком HmaL1-E82C-D114C с введенной дисульфидной связью, непосредственно в комплексе с рРНК находится 1/3 белка, 2/3 белка остаются в свободном состоянии. Из этого можно сделать вывод о том, что введенная во II-ой домен дисульфидная связь не нарушает биологическую функцию белка, но снижает ее. Это можно объяснить тем, что уменьшение подвижности структуры домена II (из-за дисульфидной связи) повлияло на процесс узнавания целевой рРНК, для которого, возможно, необходима его подвижность.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель данной работы заключалась в подтверждении нашего предположения, что введение дисульфидных связей в участок, предсказываемый программами типа PONDR-FIT IsUnstruct как нативно-развернутый, приведет к повышению стабильности и уменьшению подвижности структуры белка, в то время как введение дисульфидной связи в такой же участок, предсказанный как структурированный, не повлияет на стабильность белка. В структурах белков AaeL1 и HmaL1 мы нашли участок, одинаковый по пространственной структуре, но предсказанный программами как структурированный в белке AaeL1 и как неупорядоченный в белке HmaL1. Мы спроектировали дисульфидные связи в одинаковом положении в двух белках и исследовали их влияние на стабильность их структур. В результате можно сделать следующие выводы: (1) дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как структурированный, не повлияла на стабильность белка AaeL1; (2) дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как нативно-развернутый, привела к повышению температуры плавления белка HmaL1; (3) мутантный белок HmaL1 с повышенной стабильностью сохранил свою функциональную активность. Таким образом, мы получили подтверждение нашей гипотезы о том, что предсказания программ типа PONDR-FIT и IsUnstruct действительно коррелируют с ослабленностью или стабильностью участков полипептидной цепи белка L1, а не с особенностями его пространственной структуры.

Результаты наших исследований, выполненных в этой и предыдущей работе [8], позволяют высказать предположение, что стабильность белка зависит не столько от структуры нативного состояния (жестко упакованного), а скорее от особенностей развернутых и промежуточных состояний (подвижных с несформировавшимися контактами). Эта мысль может показаться простой с точки зрения теоретика, но она весьма сложна с точки зрения экспериментального подтверждения и тем более с позиции экспериментатора, перед которым стоит задача увеличить стабильность конкретного белка. Выполненные нами исследования позволяют использовать программы по предсказанию нативноразвернутых участков как инструмент для поиска ослабленных частей белка, которые, в свою очередь, потенциально могут быть причиной существования более подвижных нестабильных промежуточных состояний и, соответственно, влиять на переход между нативным и другими состояниями при плавлении или разворачивании белка денатурантами.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта 18-34-00243 мол а.

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

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

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность С.В. Тищенко за предоставленный препарат рРНК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jirgensons, S.C., Hnilica, B., and Capetillo, L.S. (1966) Viscosity and conformation of calf thymus histones, *Die Makromol. Chemie*, 97, 216–224, doi: 10.1002/macp.1966.020970120.
- DeForte, S., and Uversky, V. (2016) Order, disorder, and everything in between, *Molecules*, 21, 1090, doi: 10.3390/ molecules21081090.
- 3. He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2009) Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview, *Cell Res.*, **19**, 929–949, doi: 10.1038/cr.2009.87.
- 4. Jones, D.T., and Cozzetto, D. (2015) DISOPRED3: Precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity, *Bioinformatics*, **31**, 857–863, doi: 10.1093/bioinformatics/btu744.
- 5. Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics, *Structure*, 11, 1453–1459, doi: 10.1016/j.str.2003.10.002.
- Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2010) PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 996–1010, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.011.
- Li, J., Feng, Y., Wang, X., Li, J., Liu, W., Rong, L., and Bao, J. (2015) An overview of predictors for intrinsically disordered proteins over 2010–2014, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 23446–23462, doi: 10.3390/ijms161023446.
- Nagibina, G.S., Tin, U.F., Glukhov, A.S., Melnik, T.N., and Melnik, B.S. (2016) Intrinsic disorder-based design of stabilizing disulphide bridge in Galphao protein, *Protein Pept. Lett.*, 23, 176–184, doi: 10.2174/092986652302160105130540.
- 9. Lobanov, M.Y., and Galzitskaya, O.V. (2011) The Ising model for prediction of disordered residues from protein sequence alone, *Phys. Biol.*, **8**, 35004, doi: 10.1088/1478-3975/8/3/035004.

- Nikonova, E.Yu., Tishchenko, S.V., Gabdulkhakov, A.G., Shklyaeva, A.A., Garber, M.B., Nikonov, S.V., and Nevskaya, N.A. (2011) Crystal structure of ribosomal protein L1 from the bacterium *Aquifex aeolicus*, *Crystallogr. Rep.*, 56, 648–652, doi: 10.1134/S1063774511040158.
- Gabdulkhakov, A., Tishchenko, S., Mikhaylina, A., Garber, M., Nevskaya, N., and Nikonov, S. (2017) Crystal structure of the 23S rRNA fragment specific to r-protein L1 and designed model of the ribosomal L1 stalk from *Haloarcula marismortui*, *Crystals*, 7, 37, doi: 10.3390/cryst7020037.
- Muller, M.P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeld, W., Goody, R., and Itzen, A. (2010) The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b, *Science*, 329, 946–949.
- 13. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
- 14. Senin, A.A., Potekhin, S.A., Tiktopulo, E.I., and Filimonov, V.V. (2000) Differential scanning microcalorimeter SCAL-1, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **62**, 153–160, doi: 10.1023/A:1010171013669.
- 15. Privalov, P.L., and Potekhin, S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Methods Enzymol.*, **131**, 4–51, doi: 10.1016/0076-6879(86)31033-4.
- Rao, S.T., and Rossmann, M.G. (1972) Comparison of super-secondary structures in proteins, *J. Mol. Biol.*, 4, 241–250, doi: 10.1016/0022-2836(73)90388-4.
- Camacho Córdova, D.I., Camacho Ruíz, R.M., Mateos Díaz, J.C., Córdova López, J.A., and Rodríguez González, J.A. (2014) *Haloarcula marismortui*, eighty-four years after its discovery in the Dead Sea, *Int. J. Eng. Res. Technol.*, 3, 1257–1267.

#### VERIFICATION OF THE STABILIZED PROTEIN DESIGN BASED ON THE PREDICTION OF INTRINSICALLY DISORDERED REGIONS: RIBOSOMAL PROTEINS L1

G. S. Nagibina\*, V. V. Marchenkov, K. A. Glukhova, T. N. Melnik, and B. S. Melnik

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: galina-nagibina@phys.protres.ru

Received August 9, 2019 Revised September 27, 2019 Accepted September 27, 2019

In our previous papers, we proposed the idea that programs predicting intrinsically disordered regions in amino acid sequences can be used for finding weakened sites in proteins. The regions predicted by such programs are suitable targets for the introduction of protein-stabilizing mutations. However, for each specific protein, it remains unclear what determines protein stabilization — the amino acid sequence (and accordingly, prediction of weakened sites) or the 3D structure. To answer this question, it is necessary to study two proteins with similar structures but different amino acid sequences and, consequently, different predictions of weakened regions. By introducing identical mutations into identical elements of the two proteins, we will be able to reveal whether predictions of the weakened sites or the 3D protein structure are the key factors in the protein stability increase. Here, we have chosen ribosomal proteins L1 from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* (HmaL1) and extremophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (AaeL1). These proteins are identical in their structures but different in amino acid sequences. A disulfide bond introduced into the region predicted as the structured one in AaeL1 did not lead to the increase in the protein melting temperature. At the same time, a disulfide bond introduced into the same region in HmaL1 that was predicted as a weakened one, resulted in the increase in the protein melting temperature by approximately 10°C.

Keywords: ribosomal protein L1, globular protein stabilization, protein intrinsically disordered regions, disulfide bonds

УДК 577.151.02; 577.152.2

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИ(ADP-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА\*,\*\*

© 2020 Д.К. Нилов<sup>1</sup>#, С.В. Пушкарев<sup>2</sup>#, И.В. Гущина<sup>2</sup>, Г.А. Манасарян<sup>3</sup>, К.И. Кирсанов<sup>4</sup>, В.К. Швядас<sup>1,2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vytas@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

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

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, 115478 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 19.08.2019 После доработки 16.10.2019 Принята к публикации 16.10.2019

Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 (ПАРП-1) является ключевым ферментом репарации ДНК и важной мишенью для терапии онкологических заболеваний. Сложное строение субстратов ПАРП-1 ограничивает возможности экспериментального изучения механизма реакции, однако необходимые данные могут быть получены путем молекулярного моделирования. В представленной работе впервые получена молекулярно-динамическая модель фермент-субстратного комплекса ПАРП-1, содержащего молекулу NAD $^+$  и конец цепи поли(ADP-рибозы) в виде молекулы ADP. Охарактеризованы взаимодействия с остатками активного центра, среди которых определяющую роль играют Gly863, Lys903, Glu988, а также предложен  $S_N$ 1-подобный механизм для катализируемой реакции ADP-рибозилирования. С помощью молекулярного докинга получены модели комплексов ПАРП-1 с более сложными двухзвенными фрагментами растущей цепи полимера и конкурентными ингибиторами 3-аминобензамидом и 7-метилгуанином.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** репарация ДНК, молекулярная динамика, докинг, субстраты, ингибиторы.

**DOI:** 10.31857/S0320972520010091

Поли(ADP-рибозо)полимераза 1 человека (ПАРП-1; КФ 2.4.2.30) является ферментом суперсемейства ADP-рибозилтрансфераз, который обладает ДНК-зависимой активностью и катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (ПАР, рис. 1) из молекул NAD+ [1-5]. ПАРП-1 осуществляет перенос ADP-рибозы на белок-акцептор с высвобождением никотинамида (модификации могут подвергаться боковые цепи остат-

Принятые сокращения: ПАРП-1 — поли(ADP-рибозо) полимераза 1, ПАР — поли(ADP-рибоза), МД — молекулярная динамика.

ков глутаминовой и аспарагиновой кислоты, а также лизина) [6, 7]. Далее происходит синтез полианиона ПАР путем последовательного присоединения новых звеньев ADP-рибозы с образованием гликозидных связей  $\alpha(1\rightarrow 2)$  [8, 9].

Связывание ПАРП-1 с разрывами ДНК приводит к модификации других белков, вовлеченных в метаболизм ДНК, а также к автомодификации [11, 12]. Результатом поли(АDP-рибозил) ирования является реорганизация структуры хроматина и мобилизация белков репарации для устранения повреждения [13-16]. В частности, автомодифицированная ПАРП-1 образует комплекс с белком эксцизионной репарации XRCC1, который, в свою очередь, взаимодействует с ДНК-полимеразой В и ДНК-лигазой III [17, 18]. Поскольку ПАРП-1 является ключевым ферментом репарации ДНК в опухолевых клетках, большое внимание уделяется поиску его ингибиторов, обладающих собственным антипролиферативным эффектом или действующих в сочетании с ДНК-повреждающими препара-

<sup>\*</sup>Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-253, 16.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 1, 2020.

<sup>\*\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

<sup>#</sup> Авторы внесли равный вклад в работу.

тами [19—22]. Недавно для лечения рака молочной железы и яичников были одобрены три синтетических ингибитора ПАРП-1: олапариб, рукапариб и нирапариб [23—25]. Клеточная функция ПАРП-1, а также способы ее подавления подробно рассмотрены в большом числе обзоров [26—31].

О молекулярном механизме реакции ADPрибозилирования известно не так много. В активном центре каталитического домена ПАРП-1 можно выделить участок связывания донора  $(NAD^{+})$  и участок связывания акцептора (ПАР) [32]. Молекула NAD+, по-видимому, образует водородные связи с Gly863 и гидрофобный контакт с Tyr907 подобно миметикам никотинамидного фрагмента, для которых установлена структура фермент-ингибиторных комплексов [33, 34]. Некоторые предположения относительно связывания субстрата-акцептора можно сделать на основе кристаллической структуры ПАРП-1 с неактивным структурным аналогом, аденозиндифосфатный фрагмент которого образует гидрофобный контакт с Met890 и водородные связи с Lys903 и Glu988 [35]. Карбоксильная группа остатка Glu988 находится вблизи расщепляемой *N*-гликозидной связи NAD+ и, предположительно, может выступать в роли общего основания, активирующего нуклеофильную группу субстрата-акцептора, и/или участвовать в стабилизации переходного состояния [33, 35, 36].

На данный момент нет достоверной информации о взаимной ориентации субстратов ПАРП-1, необходимой для протекания реакции, и о структуре переходных состояний и ин-

термедиатов, поэтому актуальной задачей являмоделирование фермент-субстратных комплексов на основе доступных кристаллографических данных. Детальное исследование молекулярных взаимодействий ПАРП-1 с субстратами представляет не только фундаментальный интерес, но и может создать основу для рационального дизайна эффективных конкурентных ингибиторов. Успешное решение данной задачи в настоящее время становится возможным благодаря следующим факторам: наличию многодоменной структуры апоформы 4dqy [37, 38], структуры каталитического домена со связанным аналогом субстрата-акцептора 1а26 [35] и недавнему появлению структуры каталитического домена ПАРП-1 со связанным аналогом субстрата-донора 6bhv [39].

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярную модель ПАРП-1 человека конструировали на основе кристаллической структуры 4dqy (цепи A, B, C, M и N). Координаты неразрешенной петли 576—583 в домене WGR перенесли из структуры 2cr9. Координаты петли 645—661 между WGR и каталитическим доменом были предсказаны с помощью программы Modeller 9.20 (рис. 2) [40]. Координаты аналога NAD+ перенесли из структуры 6bhv, после чего преобразовали бензамидный фрагмент в никотинамидный путем замены соответствующего атома углерода на азот. Координаты боковой цепи Arg878, взаимодействующей с адениновой группой NAD+ и обладающей существенной

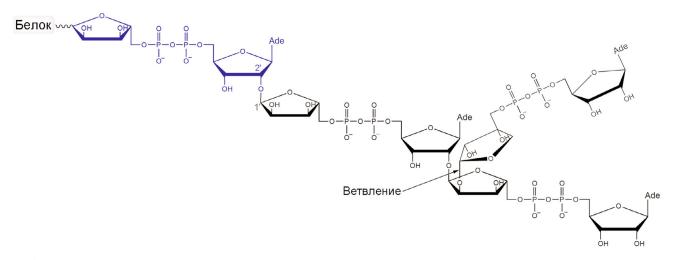
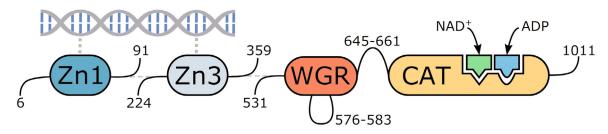


Рис. 1. Химическое строение ПАР. Синим цветом показано первое звено ADP-рибозы, присоединенное к белку-акцептору. Ветвление полимера происходит, когда в реакцию нуклеофильного замещения вовлекается «никотинамидная» рибоза ПАР. Присоединение ADP-рибозы в результате реакций элонгации и ветвления происходит в соотношении 41/1 [10]. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



**Рис. 2.** Многодоменное строение полученной модели ПАРП-1 человека со связанными молекулами ДНК, NAD<sup>+</sup> и ADP. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

конформационной подвижностью, также заимствовали из 6bhv. Координаты ADP в качестве структурного аналога субстрата-акцептора перенесли из структуры 1а26. Для наложения структур использовали программу Matt 1.00 [41].

Далее структуру оптимизировали и исследовали методом молекулярной динамики (МД) с помощью AmberTools 15 и пакета Amber 14 [42, 43], установленного на суперкомпьютере МГУ [44]. Атомы водорода добавляли с учетом ионизационных свойств остатков, в частности в имидазольном кольце остатка активного центра His862 был протонирован  $N^{\delta 1}$ -атом. Структуру окружали слоем (12 Å) воды TIP3P, для нейтрализации отрицательного суммарного заряда добавляли ионы натрия. На первой стадии минимизации энергии полученной системы (2500 шагов по методу наискорейшего спуска + 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) координаты белка, ДНК и субстратов фиксировали позиционными ограничениями  $2 \, \text{ккал/(моль} \cdot \text{Å}^2)$ на тяжелых атомах. Вторую стадию минимизации (5000 шагов наискорейшего спуска + 5000 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили без каких-либо ограничений. Затем систему разогревали от 0 до 300 К с использованием позиционных ограничений  $1 \, \text{ккал/(моль} \cdot \text{Å}^2)$ на атомах белка, ДНК и субстратов (250 пс, постоянный объем) и уравновешивали при 300 К (500 пс, постоянное давление). Достижение равновесной конформации субстратов подтверждали путем анализа среднего квадратичного отклонения их атомов от начального положения. В дальнейшем с использованием подготовленной структуры рассчитывали и анализировали траекторию равновесной симуляции МД длиною 5000 пс. Шаг интегрирования составлял 0,002 пс с учетом использования алгоритма SHAKE. Радиус отсечения невалентных взаимодействий составлял 10 А. Регуляцию температуры осуществляли по методу Ланжевена, давления – по методу Берендсена. Для молекулярномеханического описания белка и ДНК использовали силовое поле ff14SB [45], для описания молекул NAD<sup>+</sup> и ADP — параметры из базы данных Amber Parameter Database [46—48].

Среди кадров траектории равновесной симуляции выбрали структуру, в которой взаимное расположение субстратов было близко к реакционноспособной конфигурации, и провели минимизацию ее энергии (5000 шагов наискорейшего спуска + 5000 шагов по методу сопряженных градиентов). Полученную структуру использовали для ковалентного докинга в программе Lead Finder 1.1.15 [49, 50]: молекула ADP была достроена до фрагментов ПАР, состоящих из двух звеньев ADP-рибозы. Недостающие группы атомов присоединяли к С5'-атому (элонгация, ветвление) и С1'-атому (ветвление). Кроме того, с помощью Lead Finder был осуществлен стандартный докинг ингибиторов 3-аминобензамида и 7-метилгуанина в активный центр (для этого из структуры ПАРП-1 были предварительно удалены молекулы субстратов). Для визуализации структур использовали VMD 1.9.2 [51].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе доступного набора кристаллических структур ПАРП-1 была впервые сконструирована МД-модель фермент-субстратного комплекса с NAD+ и концевым фрагментом ПАР, представленным в виде молекулы ADP (рис. S1 в Приложении). Полученная сольватированная система помимо субстратов включала 703 аминокислотных остатка, 52 нуклеотида, 2 иона Zn<sup>2+</sup>, 49 ионов Na<sup>+</sup> и 73281 молекулу воды. В результате анализа траектории равновесной симуляции ПАРП-1 были обнаружены следующие важные межмолекулярные взаимодействия. Никотинамидная группа NAD<sup>+</sup> образует две водородные связи с остатком Glv863 (таблица и рис. S2 в Приложении), а также  $\pi$ -стэкинг с боковой цепью Туг907, что согласуется с резуль-

татами гомологичного моделирования, которые были получены с использованием структур других представителей суперсемейства (дифтерийного токсина и экзотоксина А) [34, 52]. Рибоза адениновой части NAD<sup>+</sup> образует водородную связь с  $N^{\epsilon 2}$ -атомом имидазольного кольца His862. Адениновый заместитель концевой рибозы ПАР формирует устойчивый гидрофобный контакт с боковой цепью Met890, а пирофосфатная группа образует водородную связь с аминогруппой Lys903, которая, в свою очередь, стабилизирует положение наиболее важного для катализа остатка Glu988. Карбоксильная группа Glu988 образует водородные связи с  $2'_{N}$ -гидроксильной группой  $NAD^+$  и  $3'_A$ -гидроксильной группой фрагмента ПАР, обеспечивая требуемое взаимное расположение субстрата-донора и субстрата-акцептора (рис. 3, а; нижние индексы «N» и «А» обозначают принадлежность к никотинамидной и адениновой рибозе).

Здесь следует вспомнить о поддерживаемом некоторыми авторами предположении о том, что Glu988 образует также водородную связь с 2'-гидроксильной группой ПАР и является акцептором протона при нуклеофильной атаке по механизму  $S_N 2$  [35, 36, 53, 54]. Однако в ходе симуляции мы не наблюдали ни образования упомянутой водородной связи, ни реакционносполинейной конфигурации ADP:O2'<sub>A</sub>, NAD+:C1'<sub>N</sub> и NAD+:N1<sub>N</sub>, характерной для механизма  $S_N$ 2. Среднее значение расстояния  $O2'_{A} \cdots C1'_{N}$  составило 4,2 Å, угла  $O2'_{A} \cdots C1'_{N}$  $\cdots$  N1<sub>N</sub> – 135° (рис. 4), в то время как необходимое для нуклеофильной атаки расстояние составляет ~3 Å, а угол не должен сильно отклоняться от значения 180° [55]. Это дает основание предположить, что катализируемая ПАРП-1 реакция ADP-рибозилирования протекает по альтернативному,  $S_N$ 1-подобному механизму (рис. 5). По-видимому, сначала происходит образование интермедиата – иона оксокарбения, который стабилизируется благодаря отрицательному заряду карбоксильной группы Glu988. Реакционный центр приобретает плоскую конфигурацию, что облегчает последующую атаку 2'-гидроксильной группой акцептора. Поскольку ПАР является отрицательно заряженным биополимером, его связывание в активном центре ПАРП-1 в качестве субстрата-акцептора может способствовать образованию иона оксокарбения. Интересно, что похожий механизм был установлен для других представителей суперсемейства ADP-рибозилтрансфераз: ПАРП-10 [56], дифтерийного токсина [57, 58], экзотоксина А [59, 60] и йота-токсина [61, 62].

Допуская возможность образования иона оксокарбения в активном центре ПАРП-1, мож-

Ключевые взаимодействия в активном центре ПАРП-1, выявленные с помощью равновесной МД-симуляции. Приведены средние значения расстояний вместе со стандартным отклонением

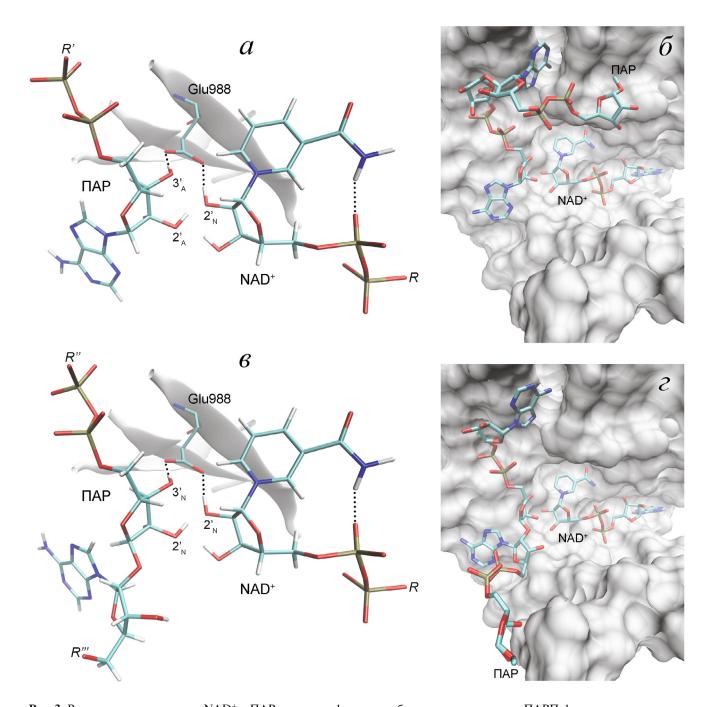
Взаимодействие	Расстояние, Å
Glu988:OE1 ··· NAD <sup>+</sup> :2′ <sub>N</sub> -OH:H Glu988:OE2 ··· ADP:3′ <sub>A</sub> -OH:H Gly863:H ··· NAD <sup>+</sup> :CONH <sub>2</sub> :O Gly863:O ··· NAD <sup>+</sup> :CONH <sub>2</sub> :H Lys903:NH <sub>3</sub> :H* ··· ADP:P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> :O Lys903:NH <sub>3</sub> :H* ··· Glu988:OE2 NAD <sup>+</sup> :CONH <sub>2</sub> :H ··· NAD <sup>+</sup> :P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> :O**	$1,7 \pm 0,1$ $1,7 \pm 0,2$ $2,0 \pm 0,2$ $2,4 \pm 0,4$ $1,9 \pm 0,3$ $2,0 \pm 0,2$ $1,9 \pm 0,2$

<sup>\*</sup> Для каждого кадра траектории в расчет принимали минимальное из расстояний до атомов водорода аминогруппы Lys903, поскольку данная группа способна претерпевать вращение.

но предложить механизм и для реакции инициации синтеза ПАР, когда акцептором ADP-рибозы служит остаток глутаминовой или аспарагиновой кислоты на поверхности модифицируемого белка. В этом случае один из атомов кислорода модифицируемой карбоксильной группы может занимать положение 2'-гидроксильной группы ПАР вблизи расщепляемой гликозидной связи. Отрицательный заряд карбоксильной группы белка-акцептора способствует расщеплению NAD+ с образованием иона оксокарбения, после чего происходит нуклеофильная атака. Данное предположение объясняет тот факт, что мутации Е988О и Е988А существенно снижают способность ПАРП-1 катализировать реакцию элонгации, но мало влияют на стадию инициации [36]. Glu988 обеспечивает реакционноспособную ориентацию субстратов (NAD+ и ПАР) и стабилизирует интермедиат при наращивании цепи ПАР. Однако на стадии инициации этот остаток не столь важен, поскольку его стабилизирующую функцию выполняет карбоксильная группа белка-акцептора.

Полученная МД-структура ПАРП-1 характеризует взаимную ориентацию NAD<sup>+</sup> и атакующей рибозы ПАР на примере модельной молекулы ADP, однако она не дает представления о положении растущей цепи полимера. Конструирование более сложных фрагментов ПАР, состоящих из двух звеньев ADP-рибозы, было осуществлено методом ковалентного докинга. Для этого был выбран кадр траектории МД-симуляции, в котором взаимное расположение субстратов близко к реакционноспособной конфигурации (рис. 4), а никотинамидная рибоза NAD<sup>+</sup> представлена в конформации 3'-экзо. В данной кон-

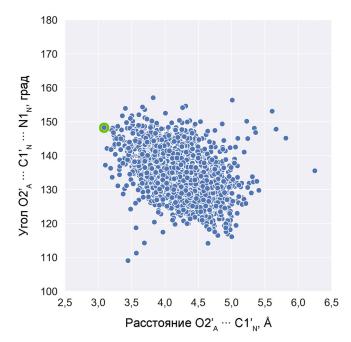
<sup>\*\*</sup> Внутримолекулярная водородная связь NAD+.



**Рис. 3.** Взаимное расположение NAD $^+$  и ПАР в моделях фермент-субстратных комплексов ПАРП-1, полученных методами МД и докинга. a и  $\delta$  — Элонгация; a и e — ветвление. Можно видеть, что положение пирофосфатной группы, присоединенной к атакующей рибозе ПАР, практически не отличается. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

формации атомы  $C2'_N$ ,  $C1'_N$ ,  $O4'_N$  и  $C4'_N$  находятся в одной плоскости (как в ионе оксокарбения), что должно облегчать образование интермедиата реакции. Далее к молекуле ADP присоединили недостающие группы атомов, получив координаты субстрата-акцептора (ПАР) для реакций элонгации и ветвления. В случае элонгации но-

вое звено переносится на концевую адениновую рибозу ПАР; реакционноспособная ориентация субстратов представлена на рис. 3, *а* и б. С определенной периодичностью также происходит ветвление полимера, когда новое звено присоединяется к «никотинамидной» рибозе (рис. 1) [10, 63, 64]. Считается, что для осуществления



**Рис. 4.** Распределение пар значений расстояние—угол для атомов в реакционном центре ПАРП-1, полученное в результате равновесной МД-симуляции. Каждая точка соответствует определенному кадру траектории, зеленым цветом отмечена структура ( $t=3234~\rm nc$ ), которую использовали для проведения докинга.

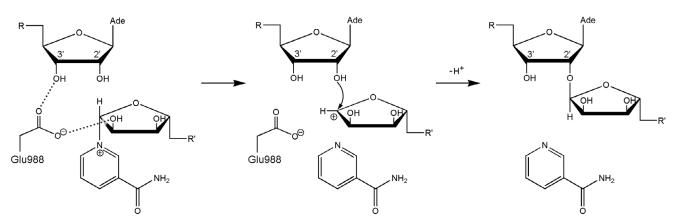
С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

данной реакции ПАР разворачивается на  $180^\circ$ , что позволяет группе  $2'_N$ -ОН занять реакционноспособное положение  $2'_A$ -ОН (рис. S3 в Приложении). Положение пирофосфатной группы, присоединенной к атакующей рибозе, не претерпевает при этом существенных изменений [35]. Для моделирования положения ПАР, соответствующего реакции ветвления, адениновая группа ADP была заменена на остаток ADP-ри-

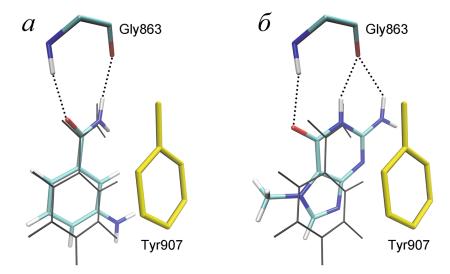
бозы с инвертированием конфигурации С1′атома (рис. 3,  $\theta$  и  $\epsilon$ ). На рис. 3,  $\theta$  и  $\epsilon$ , можно сравнить ориентацию растущей цепи полимера в случае элонгации и ветвления.

Адекватность полученной модели ферментсубстратного комплекса и важность установленных взаимодействий в активном центре МДструктуры подтвердили результаты докинга двух известных ингибиторов ПАРП-1 с предполагаемым конкурентным механизмом действия. Первое соединение, 3-аминобензамид, является хорошо изученным структурным аналогом никотинамидной группы NAD+ [65-67]. Второе соединение, 7-метилгуанин, представляет собой новый ингибитор ПАРП с перспективным профилем фармакокинетики и токсичности. Данный метаболит нуклеиновых кислот усиливает апоптотическую гибель раковых клеток в комбинации с цисплатином и доксорубицином in vitro, не оказывая при этом существенного побочного действия на организм в предварительных испытаниях *in vivo* [68–70]. Молекулярный докинг показал, что 3-аминобензамид и 7-метилгуанин занимают участок никотинамидной группы NAD<sup>+</sup>, образуя свойственные субстрату взаимодействия с остатками Gly863 и Tyr907 (рис. 6). В случае 7-метилгуанина функциональная амидная группа встроена в систему конденсированных колец, однако это не мешает формированию водородных связей с Gly863 (рис. 6,  $\delta$ ).

В результате проведенных исследований создана модель фермент-субстратного комплекса ПАРП-1 человека. При анализе МД-траектории комплекса охарактеризованы взаимная ориентация субстрата-донора (молекула NAD<sup>+</sup>) и субстрата-акцептора (фрагмент ПАР), а также их взаимодействия с остатками активного центра, среди которых определяющую роль играют Gly863, Lys903 и Glu988. Это позволило сделать предположение о том, что катализируемый



**Рис. 5.** Предполагаемый  $S_N$ 1-подобный механизм реакции ADP-рибозилирования, катализируемой ПАРП-1. Отрицательный заряд карбоксильной группы Glu988 стабилизирует интермедиат (ион оксокарбения)



**Рис. 6.** Моделирование связывания 3-аминобензамида (*a*) и 7-метилгуанина (*б*) в активном центре ПАРП-1. Желтым цветом показана фенильная группа Туг907, образующая с ингибитором  $\pi$ -стэкинг. Серым цветом показаны координаты никотинамидной группы NAD<sup>+</sup> в МД-структуре ПАРП-1.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

ПАРП-1 синтез ПАР происходит по  $S_N$ 1-подобному механизму через образование ионов оксокарбения. Методом докинга показано, что участок связывания никотинамидной группы NAD является мишенью для ингибиторов 3-аминобензамида и 7-метилгуанина. В дальнейшем полученная модель фермент-субстратного комплекса может быть использована при рациональном дизайне ингибиторов ПАРП нового поколения. В частности, с помощью гибридных квантово-механических/молекулярно-механических методов на ее основе может быть получена структура интермедиата ПАРП-1 для скрининга молекул, комплементарных соответствующему конформационному состоянию активного центра.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-315-00389 мол а, и № 17-08-01614 A).

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

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

**Благодарности.** Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Cohen, M.S., and Chang, P. (2018) Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 236–243.
- Taniguchi, T. (1987) Reaction mechanism for automodification of poly(ADP-ribose) synthetase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 1008–1012.
- Lin, H. (2007) Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme, Org. Biomol. Chem., 5, 2541–2554.
- Naegeli, H., Loetscher, P., and Althaus, F.R. (1989) Poly ADP-ribosylation of proteins. Processivity of a post-translational modification, *J. Biol. Chem.*, 264, 14382–14385.
- 5. Ménard, L., Thibault, L., and Poirier, G.G. (1990) Reconstitution of an *in vitro* poly(ADP-ribose) turnover system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 45–58.

- Tao, Z., Gao, P., and Liu, H.W. (2009) Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 14258–14260.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009) Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites, *Nucleic Acids Res.*, 37, 3723–3738.
- 8. Drenichev, M.S., and Mikhailov, S.N. (2015) Poly(ADPribose) a unique natural polymer structural features, biological role and approaches to the chemical synthesis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **34**, 258–276.
- 9. Miwa, M., Ishihara, M., Takishima, S., Takasuka, N., Maeda, M., Yamaizumi, Z., Sugimura, T., Yokoyama, S.,

- and Miyazawa, T. (1981) The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1  $\rightarrow$  2) ribose-ribose linkage, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2916–2921.
- Keith, G., Desgrès, J., and de Murcia, G. (1990) Use of two-dimensional thin-layer chromatography for the components study of poly(adenosine diphosphate ribose), *Anal. Biochem.*, 191, 309–313.
- 11. Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1993) Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular, *J. Biol. Chem.*, **268**, 22575–22580.
- Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (1999) Biochemical characterization of mono(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase, *Biochemistry*, 38, 3948–3953.
- Hassler, M., and Ladurner, A.G. (2012) Towards a structural understanding of PARP1 activation and related signalling ADP-ribosyl-transferases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 22, 721–729.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 517–528.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 789–829.
- Jagtap, P., and Szabó, C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 421–440.
- Brem, R., and Hall, J. (2005) XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells, *Nucleic Acids Res.*, 33, 2512–2520.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3563–3571.
- Jain, P.G., and Patel, B.D. (2019) Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents a recent update, *Eur. J. Med. Chem.*, 165, 198–215.
- Martin, S.A., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2008) DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18, 80–86.
- Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Pérez, J.M. (2006) Poly(ADPribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 1, 39-53.
- Nilov, D.K., Yashina, K.I., Gushchina, I.V., Zakharenko, A.L., Sukhanova, M.V., Lavrik, O.I., and Švedas, V.K. (2018) 2,5-Diketopiperazines: a new class of poly(ADPribose)polymerase inhibitors, *Biochemistry (Moscow)*, 83, 152–158.
- Frampton, J.E. (2015) Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, 29, 143–150.
- Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., Sapino, A., and Valabrega, G. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 13, 392–410.

- 25. Zimmer, A.S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J.M. (2018) Update on PARP inhibitors in breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **19**, 21.
- 26. Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 610–621.
- 27. Ryu, K.W., Kim, D.S., and Kraus, W.L. (2015) New facets in the regulation of gene expression by ADP-ribosylation and poly(ADP-ribose) polymerases, *Chem. Rev.*, **115**, 2453–2481.
- Curtin, N.J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, 34, 1217–1256.
- 29. Ferraris, D.V. (2010) Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic, *J. Med. Chem.*, **53**, 4561–4584.
- 30. Virág, L., and Szabó, C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, *Pharmacol. Rev.*, **54**, 375–429.
- 31. Малюченко Н.В., Котова Е.Ю., Кулаева О.И., Кирпичников М.П., Студитский В.М. (2015) Ингибиторы PARP1: разработка противоопухолевых препаратов, *Acta Naturae*, 7, 30–41.
- 32. Barkauskaite, E., Jankevicius, G., and Ahel, I. (2015) Structures and mechanisms of enzymes employed in the synthesis and degradation of PARP-dependent protein ADP-ribosylation, *Mol. Cell*, **58**, 935–946.
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7481–7485.
- 34. Ruf, A., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998) Inhibitor and NAD<sup>+</sup> binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling, *Biochemistry*, **37**, 3893–3900.
- 35. Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998) The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis, *J. Mol. Biol.*, **278**, 57–65.
- 36. Marsischky, G.T., Wilson, B.A., and Collier, R.J. (1995) Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins, *J. Biol. Chem.*, **270**, 3247–3254.
- 37. Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1, *Science*, **336**, 728–732.
- Langelier, M.F., Eisemann, T., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. (2018) PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 53, 187–198.
- Langelier, M.F., Zandarashvili, L., Aguiar, P.M., Black, B.E., and Pascal, J.M. (2018) NAD<sup>+</sup> analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains, *Nat. Commun.*, 9, 844.
- Sali, A., and Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.*, 234, 779–815.
- 41. Menke, M., Berger, B., and Cowen, L. (2008) Matt: local flexibility aids protein multiple structure alignment, *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e10.

- Case, D.A., Berryman, J.T., Betz, R.M., Cerutti, D.S., Cheatham, T.E. 3rd, et al. (2015) AMBER 2015. University of California, San Francisco.
- Salomon-Ferrer, R., Case, D.A., and Walker, R.C. (2013) An overview of the Amber biomolecular simulation package, WIREs Comput. Mol. Sci., 3, 198–210.
- Воеводин В.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. (2012) Практика суперкомпьютера «Ломоносов», Открытые системы, 7, 36—39.
- Maier, J.A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, 11, 3696–3713.
- Walker, R.C., de Souza, M.M., Mercer, I.P., Gould, I.R., and Klug, D.R. (2002) Large and fast relaxations inside a protein: calculation and measurement of reorganization energies in alcohol dehydrogenase, *J. Phys. Chem. B*, 106, 11658–11665.
- Pavelites, J.J., Gao, J., Bash, P.A., and MacKerell, A.D. Jr. (1997) A molecular mechanics force field for NAD<sup>+</sup>, NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides, *J. Comput. Chem.*, 18, 221–239.
- 48. Meagher, K.L., Redman, L.T., and Carlson, H.A. (2003) Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field, *J. Comput. Chem.*, **24**, 1016–1025.
- Stroganov, O.V., Novikov, F.N., Stroylov, V.S., Kulkov, V., and Chilov, G.G. (2008) Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, 48, 2371–2385.
- 50. Захаренко А.Л., Суханова М.В., Ходырева С.Н., Новиков Ф.Н., Стройлов В.С., Нилов Д.К., Чилов Г.Г., Швядас В.К., Лаврик О.И. (2011) Усовершенствованная процедура поиска потенциальных ингибиторов поли(АДФ-рибозо)-полимеразы-1 с использованием молекулярного докинга, *Мол. биология*, **45**, 565–569.
- 51. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33–38.
- 52. Иванисенко Н.В., Жечев Д.А., Иванисенко В.А. (2016) Структурное моделирование мод связывания НАД<sup>+</sup> с ПАРП-1, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **20**, 857—862.
- 53. Bellocchi, D., Costantino, G., Pellicciari, R., Re, N., Marrone, A., and Coletti, C. (2006) Poly(ADP-ribose)-polymerase-catalyzed hydrolysis of NAD<sup>+</sup>: QM/MM simulation of the enzyme reaction, *ChemMedChem*, 1, 533–539.
- 54. Alemasova, E.E., and Lavrik, O.I. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811–3827.
- 55. Yang, S.-Y., Fleurat-Lessard, P., Hristov, I., and Ziegler, T. (2004) Free energy profiles for the identity S<sub>N</sub>2 reactions Cl<sup>-</sup> + CH<sub>3</sub>Cl and NH<sub>3</sub> + H<sub>3</sub>BNH<sub>3</sub>: a constraint *ab initio* molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. A*, 108, 9461–9468.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Lüscher, B. (2008) Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation, *Mol. Cell*, 32, 57–69.

- 57. Bell, C.E., and Eisenberg, D. (1996) Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide, *Biochemistry*, **35**, 1137–1149.
- 58. Parikh, S.L., and Schramm, V.L. (2004) Transition state structure for ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2 catalyzed by diphtheria toxin, *Biochemistry*, **43**, 1204–1212.
- Jørgensen, R., Merrill, A.R., Yates, S.P., Marquez, V.E., Schwan, A.L., Boesen, T., and Andersen, G.R. (2005) Exotoxin A–eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry, *Nature*, 436, 979–984.
- Jørgensen, R., Wang, Y., Visschedyk, D., and Merrill, A.R. (2008) The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction, *EMBO Rep.*, 9, 802–809.
- Tsuge, H., Nagahama, M., Oda, M., Iwamoto, S., Utsunomiya, H., Marquez, V.E., Katunuma, N., Nishizawa, M., and Sakurai, J. (2008) Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by Clostridium perfringens iota-toxin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 7399–7404.
- 62. Tsurumura, T., Tsumori, Y., Qiu, H., Oda, M., Sakurai, J., Nagahama, M., and Tsuge, H. (2013) Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 4267–4272.
- Rolli, V., O'Farrell, M., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1997) Random mutagenesis of the poly(ADPribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching, *Biochemistry*, 36, 12147–12154.
- 64. Kistemaker, H.A., Overkleeft, H.S., van der Marel, G.A., and Filippov, D.V. (2015) Branching of poly(ADP-ribose): synthesis of the core motif, *Org. Lett.*, **17**, 4328–4331.
- 65. Banasik, M., and Ueda, K. (1994) Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions, *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 185–197.
- 66. Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Cepeda, V., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Pérez, J.M. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells, *Med. Chem.*, 2, 47–53.
- Zheng, Y.D., Xu, X.Q., Peng, F., Yu, J.Z., and Wu, H. (2011) The poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3aminobenzamide suppresses cell growth and migration, enhancing suppressive effects of cisplatin in osteosarcoma cells, *Oncol. Rep.*, 25, 1399–1405.
- 68. Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликов А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., Михайлов С.Н., Лаврик О.И., Швядас В.К. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120–128.
- Nilov, D., Kirsanov, K., Antoshina, E., Maluchenko, N., Feofanov, A., Kurgina, T., Zakharenko, A., Khodyreva, S., Gerasimova, N., Studitsky, V., Lavrik, O., and Švedas, V. (2018) 7-Methylguanine: a natural DNA repair inhibitor and a promising anticancer compound, *FEBS Open Bio*, 8, P.09-198-W.
- Maluchenko, N., Nilov, D., Feofanov, A., Lys, A., Kutuzov, M., Gerasimova, N., and Studitsky, V. (2019) 7-Methylguanine traps PARP-1 on nucleosomes: spFRET microscopy study, *Microsc. Microanal.*, 25(S2), 1282–1283.

## MODELING OF THE ENZYME-SUBSTRATE COMPLEXES OF HUMAN POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 1\*,\*\*

D. K. Nilov<sup>1#</sup>, S. V. Pushkarev<sup>2#</sup>, I. V. Gushchina<sup>2</sup>, G. A. Manasaryan<sup>3</sup>, K. I. Kirsanov<sup>4</sup>, and V. K. Švedas<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Received August 19, 2019 Revised October 16, 2019 Accepted October 16, 2019

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) is a key DNA repair enzyme and an important target for cancer treatment. Conventional methods of studying the PARP-1 reaction mechanism have limitations because of the complex structure of PARP-1 substrates, however, the necessary data can be obtained by molecular modeling. In the present work, a molecular-dynamics model for the PARP-1 enzyme—substrate complex containing NAD+ molecule, and the end of poly(ADP-ribose) chain in the form of ADP molecule was obtained for the first time. Interactions with the active site residues have been characterized where Gly863, Lys903, Glu988 play a crucial role, and an  $S_N$ 1-like mechanism for the enzymatic ADP-ribosylation reaction has been proposed. Models of PARP-1 complexes with more sophisticated two-unit fragments of the growing polymer chain as well as with competitive inhibitors 3-aminobenzamide and 7-methylguanine have been obtained by molecular docking.

Keywords: DNA repair, molecular dynamics, docking, substrates, inhibitors

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia
 Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Institute of Carcinogenesis, 115478 Moscow, Russia

УДК 577.218

# СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ мРНК ГЕНА *РТРN11* ПРЕПЯТСТВУЕТ ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ, УСТОЙЧИВОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ И ОНКОГЕН-ИНДУЦИРУЕМОЕ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ, В ОТВЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ОНКОГЕНА BRAF V600E В КЛЕТКАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА\*,\*\*\*

© 2020 Л.В. Путляева<sup>1,2</sup>, Д.Э. Демин<sup>1,3</sup>, А.Н. Уварова<sup>1,4</sup>, Л.С. Зиневич<sup>5</sup>, М.М. Прокофьева<sup>1</sup>, Г.Р. Газизова<sup>6</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>6</sup>, А.М. Шварц<sup>1</sup>\*\*\*

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: shvarec@yandex.ru

 $^{2}$  Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологии, 121205 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия <sup>6</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии.

° Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, 420008 Казань, Россия

> Поступила в редакцию 21.09.2019 После доработки 21.09.2019 Принята к публикации 20.10.2019

Сигнальный путь MAPK (RAS/BRAF/MEK/ERK) представляет собой киназный каскад, участвующий в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и выживаемости в ответ на внешние стимулы. В различных опухолях обнаруживается мутация V600 Е гена BRAF, приводящая к 500× усилению киназной активности BRAF. Однако монотерапия селективными ингибиторами BRAF V600E часто приводит к реактивации сигнального каскада МАРК и возникновению резистентности к ингибитору, поэтому разрабатываются новые мишени для дополнительного ингибирования компонентов аберрантно активированного каскада. Недавно было обнаружено, что резистентность к ингибиторам онкогена BRAF V600E может быть связана с активностью тирозинфосфатазы SHP-2, кодируемой геном *PTPN11*. В данной работе мы проанализировали влияние подавления транскрипции *PTPN11* на экспрессию генов, задействованных в регуляции пролиферации, устойчивости к химиотерапии и онкоген-индуцируемого старения (ОИС) клеток, в условиях селективного подавления BRAF V600E на модели фолликулярного эпителия щитовидной железы. Было показано, что подавление экспрессии РТРN11 с помощью малых интерферирующих РНК действительно предотвращает повышение экспрессии генов CCNA1 и NOTCH4, участвующих в формировании лекарственной устойчивости опухолей, в ответ на действие вемурафениба. С другой стороны, подавление экспрессии РТРN11 блокирует активацию транскрипции ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и вовлеченных в процесс ОИС: p21, p15, p16, RB1 и IGFBP7, в ответ на экспрессию онкогена BRAF V600E. Таким образом, можно предположить, что фосфатаза SHP-2 может участвовать не только в формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток, но и в развитие процесса ОИС клетки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** SHP-2, BRAF V600E, опухоли щитовидной железы, онкоген-индуцируемое старение. **DOI:** 10.31857/S0320972520010108

Принятые сокращения: EGFR — рецептор эпидермального фактора роста, ОИС — онкоген-индуцируемое старение, ЩЖ — щитовидная железа, РВ-ПЦР — ПЦР в реальном времени.

<sup>\*</sup> Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-271, 02.12.2019.

<sup>\*\*</sup> Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 1, 2020.

<sup>\*\*\*</sup> Адресат для корреспонденции.

Аберрантная активация сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK (МАРК-каскад) способствует выживанию и метастазированию клеток и является часто встречающимся механизмом возникновения и прогрессии рака [1]. Одной из наиболее часто встречающихся драйверных мутаций, затрагивающих компоненты данного каскада, является мутация BRAF V600E, встречающаяся во многих типах рака, в частности, рака щитовидной железы (ЩЖ) [2]. В клетках, содержащих белок BRAF V600E, повышены уровни хромосомной нестабильности и митотической активности, а также способность к инвазии за счет МЕК-зависимого увеличения экспрессии матричных металлопротеиназ (например, MMP-3, MMP-9 и MMP-13). BRAF V600E-содержащие опухоли имеют более агрессивный характер [3] и ассоциируются с плохим ответом на терапию радиоактивным йодом и с повышенной смертностью пациентов [4]. Учитывая все вышеописанные данные, в последние годы BRAF V600E стал основной терапевтической мишенью в этих видах рака.

SHP-2, кодируемая геном *PTPN11*, была первой протеинфосфатазой, идентифицированной как онкоген [5–7]. Она экспрессируется в различных типах клеток и участвует в онкогенных процессах при лейкемии, раке груди и легкого, регулируя процессы инвазии, метастазирования, апоптоза, онкоген-индуцированного старения (ОИС), повреждения ДНК, пролиферации клеток, прогрессии клеточного цикла и лекарственной устойчивости [8, 9]. Активность SHP-2, как полагают, играет важную роль в активации белков семейства Ras [10, 11], JAK/STAT, PI3K/Akt и других компонентов сигнальных каскадов [12].

Инактивация гена *PTPN11* приводит к гибели в эмбриональном периоде и множественным дефектам развития на стадии гаструляции у различных типов организмов - мышей, мух, червей [13]. Также к физиологическим функциям SHP-2 относится регуляция функционирования сигнального пути инсулина [14], участие в развитии сердца, и центральной нервной системы [15, 16]. В опухолях различной этиологии роль данной фосфатазы различается в зависимости от стадии и локализации опухоли. SHP-2 выполняет роль опухолевого супрессора при раке печени [17] и раке кости/хряща [18] и напротив, является онкогеном при лейкемии, раке легких, груди и меланоме [19]. Активирующие мутации PTPN11 были обнаружены в пробах, взятых у больных с острым миелоидным лейкозом, раком желудка, глиобластомой и анапластической крупноклеточной лимфомой, что и позволило определить *PTPN11* как протоонкоген [20].

Экспрессия *PTPN11* повышена и у пациентов с опухолями щитовидной железы, она коррелирует с низкой степенью дифференцировки опухолей, высоким уровнем злокачественности и увеличением количества метастазов в лимфатических узлах [21]. В той же мере высокий уровень экспрессии *PTPN11* выявляется в тиреоидных опухолевых клеточных линиях SW579, IHH-4, FTC-133, TPC-1, DRO, TA-К и ML-1 [21]. Ha мышиной модели легочной аденокарциномы и клеточных моделях рака прямой кишки было показано, что ингибирование SHP-2 может предотвращать реактивацию каскада RAS/RAF/ MEK/ERK, опосредованную активацией рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) [22, 23]. Также известно, что подавление экспрессии PTPN11 с помощью антисмысловых олигонуклеотидов замедляет рост опухолевых клеток и индуцирует апоптоз в тиреоидной клеточной линии SW579 [21]. В то же время существуют данные и о позитивном, и о негативном влиянии активирующих мутаций *PTPN11* на работу сигнального каскада Ras/MAPK у больных с синдромом Нунана [14]. Существуют данные об отсутствии влияния ингибирования экспрессии PTPN11 с помощью shRNA на рост и пролиферацию опухолевой клеточной линии A2058, содержащей мутацию BRAF V600E [24].

Недавно было обнаружено, что тирозинфосфатаза SHP-2 часто активирована в образцах меланомы человека и клеточных линиях меланомы. Также было показано, что SHP-2 участвует в активации сигнального каскада RAS/RAF/MAPK в клетках меланомы, экспрессирующих мутантный белок NRAS, и в клетках, экспрессирующих вRAF дикого типа (WT), а нокдаун *PTPN11* приводит к подавлению деления клеток и активации ERK в линиях клеток меланомы человека WM3211 и MeWo [19].

Вемурафениб (PLX4032) является низкомолекулярным ингибитором BRAF V600E и был одобрен Управлением США по санитарному надзору для терапии метастатической меланомы в 2011 году [25]. При терапии меланомы и карциномы щитовидной железы было обнаружено, что вемурафениб индуцирует стимуляцию передачи сигнала через рецепторные тирозиновые киназы (РТК), что может приводить к быстрой реактивации и стимуляции передачи сигнала через EGFR [26, 27]. В свою очередь, тирозинфосфатаза SHP-2 участвует в передаче сигнала активированных рецепторов EGF p21<sup>Ras</sup> (RASA1), к другим сигнальным молекулам, вследствие чего ингибирование SHP-2 может уменьшать реактивацию МАРК-каскада. Согласно некоторым данным, вемурафениб может вызывать активацию SHP-2 и реактивацию передачи сигнала через MEK-ERK при наличии экспрессии фактора роста гепатоцитов (HGF) в вемурафениб-резистентных клетках [22].

Целью данной работы была оценка влияния подавления транскрипции *PTPN11* на экспрессию генов, задействованных в регуляции пролиферации, устойчивости к химиотерапии и ОИС клеток в условиях селективного подавления BRAF V600E. Для определения групп генов, экспрессия которых меняется наиболее выраженно в данном эксперименте, был проведен транскриптомный анализ. На основе данного анализа был выбран ряд генов, задействованных в регуляции клеточного цикла и реализации программы клеточного старения, и для них был произведен анализ экспрессии с помощью количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). В результате данной работы мы обнаружили, что подавление экспрессии гена *PTPN11* с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК, siRNA) снижает влияние экспрессии онкогена BRAF V600E на транскрипцию ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. В частности, подавление транскрипции *PTPN11* препятствует повышению экспрессии (в ответ на действие BRAF V600E и/или вемурафениба) генов, вовлеченных в онкоген-индуцированное старение: *RB1*, *p21*, *p15*, p16 и *IGFBP*. Это позволяет предполагать, что тирозинфосфатаза SHP-2 участвует в индукции ОИС клетки и, возможно, за счет этого выполняет функцию опухолевого супрессора.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование лентивирусных векторов, содержащих кодирующую последовательность гена **BRAF** с мутацией V600E. Для клонирования гена содержащего онкогенную мутацию V600E, 5'-конец гена BRAF вырезали из коммерчески доступной плазмиды pBABE-Puro-BRAF(V600E) («Addgene», США) [28] по сайтам рестрикции BamHI и MunI, а 3'-конец амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры BRAF-in-Mun-F и BRAF-Not-R (таблица). В качестве вектора использовали коммерчески доступную плазмиду LeGO-iPuro2, содержащую ген устойчивости к пуромицину («Lentiviral Gene Ontology Vectors», Германия). В последовательность плазмиды заранее вводили сайты рестрикции BamHI (5'-конец) и NotI (3'-конец) для клонирования в лентивирусный вектор. Последовательности всех использованных в работе праймеров приведены в таблице.

Работа с клеточной линией и трансдукция лентивирусными векторами. Клеточную линию иммор-

тализованных клеток эпителия ШЖ Nthy-ori 3-1 («Sigma», США) выращивали в среде RPMI1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», Франция), L-глютамина (2 мМ), смеси пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), а также с добавлением пирувата натрия (1 мМ). На основе данной линии были получены 2 клеточных линии – деривата – трансдуцированные двумя разными вариантами лентивирусных векторов: исходным вектором LeGO-iPuro2 и вектором iPuro2-BRAF V600E, несущим драйверную онкогенную мутацию V600E гена *BRAF* человека. Вирусные частицы были получены, как описано в статье Prokofjeva et al. [29]. Селекцию трансдуцированных клеток на пуромицине (финальная концентрация 1 мкг/мл) проводили в течение 7 дней. Изменение транскрипционной программы клетки после встраивания целевых генов дополнительно подтверждали с помощью РВ-ПЦР с использованием праймеров CCND1 F/R, PAPSS2 F/R, FBLN1 F/R, (таблица), а также с помощью анализа данных экспрессионного профилирования.

Подавление экспрессии гена *PTPN11* и селективное подавление BRAF V600E. Для ингибирования BRAF V600E использовали селективный ингибитор — вемурафениб (PLX4032, «Selleck», США) в концентрации 1 мкМ. Подавление гена PTPN11 в клетках Nthy-ori 3.1 и Nthy-ori 3.1/ BRAF V600E проводили с помощью малых интерферирующих РНК, для трансфекции использовали реагент RNAiMAX («Thermo fisher scientific», США) согласно протоколу производителя. В случае совместного использования миРНК добавлялись через 72 ч после добавления вемурафениба. Для нокдауна гена *PTPN11* использовали ранее опубликованные последовательности миРНК и последовательности соответствующих контрольных scRNA [30] (табл. S1 Приложения).

Выделение РНК, синтез кДНК и количественная РВ-ПЦР. Суммарная РНК из клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E была выделена с использованием реагента Trizol («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 2 мкг тотальной РНК при помощи набора ММLV RT Kit («Евроген», Россия). Количественный ПЦР анализ проводили, как описано в статье Schwartz et al. [31]. Последовательности праймеров приведены в соответствующем разделе таблицы.

**Вестерн-блот анализ.** Вестерн-блот анализ проводили, как описано в статье Afanasyeva et al. [32]. Лизаты клеток смешивали в соотношении 3/1 с 4× буфером Лэммли, инкубировали 5 мин

Последовательности использованных в работе праймеров

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров	Описание
1	2	3
PTPN11-F	5'-CGGTGAATGACTTTTGGCGG-3'	праймеры для анализа
PTPN11-R	5'-GTTCCTAACACGCATGACGC-3'	экспрессии <i>PTPN11</i>
PTPN11siRNA-F PTPN11siRNA-R	5'-GGAGAACGGUUUGAUUCUUTT-3' 5'-AAGAAUCAAACCGUUCUCCTCtt-3'	РНК-олигонуклеотиды с двумя дезоксирибонуклеотидами на 3'-конце, используемые для получения siRNA
PTPN11scRNA-F PTPN11scRNA-R	5'-AGUACAGCAAACGAUACGGtt-3' 5'-CCGUAUCGUUUGCUGUACUtt-3'	РНК-олигонуклеотиды с двумя дезоксирибонулеотидами на 3'-конце, используемые для получения scRNA
bACT-F	5'-TGCGTGACATTAAGGAGAG-3'	праймеры для анализа
bACT-R	5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3'	экспрессии β-актина
GAPDH-F	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'	праймеры для анализа
GAPDH-R	5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGG-3'	экспрессии <i>GAPDH</i>
CCND1-F	5'-GGCGGAGGAGAACAAACAGA-3'	праймеры для анализа
CCND1-R	5'-TGTGAGGCGGTAGTAGGACA-3'	экспрессии <i>CCND1</i>
PAPSS2-F	5'-TGCACTTTGACACCCTGCT-3'	праймеры для анализа
PAPSS2-R	5'-CAGCGTTCCTCTTTTCTGTGT-3'	экспрессии <i>PAPSS2</i>
FBLN1-F FBLN1-R	5'-ATCAGAAGGACTGCTCGCTG-3' 5'-ATGGCAGCACCTCTTCACAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>FBLN1</i>
BRAF-in-Mun-F	5'-TGATGATGAGAGGTCTAATCCCAGAGTG-3'	праймеры для клонирования
BRAF-Not-R	5'-TTTTGCGGCCGCTCAGTGGACAGGAAACGCACCA-3'	С-конца BRAF(V600E)
P21-F P21-R	5'-ACTCTCAGGGTCGAAAACGG-3' 5'-GATGTAGAGCGGGCCTTTGA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p21</i>
MAPK3-F MAPK3-R	5'-CACCCTGGAAGCCATGAGAG-3' 5'-TGGCGGAGTGGATGTACTTG-3'	праймеры для анализа экспрессии МАРКЗ ( <i>ERKI</i> )
CCNA1-F	5'-TAGGGCTGCTAACTGCAAATGG-3'	праймеры для анализа
CCNA1-R	5'-CCGGTGTCTACTTCATACACATCC-3'	экспрессии <i>CCNA1</i>
CCND2-F	5'-ATCCGCAAGCATGCTCAGAC-3'	праймеры для анализа
CCND2-R	5'-GCTCAGTCAGGGCATCACAA-3'	экспрессии <i>CCND2</i>
CCNG2-F	5'-GCCCAGAACCTCCACAACAG-3'	праймеры для анализа
CCNG2-R	5'-GGTGCACTCTTGATCACTGG-3'	экспрессии <i>CCNG2</i>
CDKN1C-F	5'-AAGAGATCAGCGCCTGAGAAG-3'	праймеры для анализа
CDKN1C-R	5'-TGGGCTCTAAATTGGCTCACC-3'	экспрессии <i>CDKN1C</i>
Notch4-F	5'-GGAGGAAGAAGAGGGGCAGT-3'	праймеры для анализа
Notch4-R	5'-CCCTCTGGGTCTGACCACT-3'	экспрессии <i>Notch4</i>
CCNC-F CCNC-R	5'-AGTTATTGCCACTGCTACGGT-3' 5'-AGCAGCAGCAATCAATCTTGT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCNC</i>
CCNB2-F	5'-AGTTCCAGTTCAACCCACCAA-3'	праймеры для анализа
CCNB2-R	5'-TTGCAGAGCAAGGCATCAGA-3'	экспрессии <i>CCNB2</i>
DUSP6-F	5'-ACCTGGAAGGTGGCTTCAGT-3'	праймеры для анализа
DUSP6-R	5'-GCACTATTGGGGTCTCGGTC-3'	экспрессии <i>DUSP6</i>
Mek1-F	5'-ATGCCCAAGAAGAAGCCGAC-3'	праймеры для анализа
Mek1-R	5'-GCTCTAGCTCCTCCAGCTTC-3'	экспрессии <i>Mek1</i>

1	2	3
P15-F P15-R	5'-GGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCGTT-3' 5'-GCATGCCCTTGTTCTCCTCG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p15</i>
P16-F P16-R	5'-GGGGGCACCAGAGGCAGT-3' 5'-GGTTGTGGCGGGGGCAGTT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p16</i>
IGFBP7-F IGFBP7-R	5'-GGCATGGAGTGCGTGAAGAG-3' 5'-CTTGCTGACCTGGGTGATGG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>IGFBP7</i>
LeGO-BRAF-F LeGO-BRAF-R	5'-TTCACCGCAGTGCATCAGAA-3' 5'-AAACGCACACCGGCCTTATT-3'	праймеры для анализа экспрессии лентивирусного вектора, содержащего ген <i>BRAF V600E</i>
IL8-F IL8-R	5'-ACCACCGGAAGGAACCATCT-3' 5'-GAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'	праймеры для анализа экспрессии $IL8$
VEGFA-F VEGFA-R	5'-CTTGCCTTGCTGCTCTACCT-3' 5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>VEGFA</i>
RB1-F RB1-R	5'-GGACCGAGAAGGACCAACTG-3' 5'-CTTCTGGGTCTGGAAGGCTG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>RB1</i>
IL6-F IL6-R	5'-CATCCTCGACGGCATCTCA-3' 5'-CAGGCAAGTCTCCTCATTGAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>IL6</i>

при 95 °C и вносили в 10%-ный ПААГ из расчета 30 мкг белка на лунку. Анализ фосфорилированного варианта белка Erk1/2 проводили с использованием антител Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) («Cell signaling», США) в разведении 1: 2000 согласно протоколу производителя; в качестве вторичных антител были использованы конъюгированные с пероксидазой хрена антитела козы к IgG кролика («Thermo Scientific», США) в разведении 1: 30 000. Для анализа содержания тотального Erk1/2 использовали антитела p44/42 MAPK (Erk1/2) («Cell signaling», США) в разведении 1: 2000 и вторичные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой («Thermo Scientific», США) в разведении 1 : 30 000.

Анализ транскриптома клеток. Тотальные РНК клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/ BRAF V600E были получены, как описано выше. Из 400 нг тотальной РНК была выделена мРНК с помощью набора реагентов NebNext PolyA mRNA Isolation Module («New England Biolabs», Англия). Полученная мРНК была фрагментирована (14 мин при 94 °С) в присутствии случайных праймеров. На матрице фрагментов мРНК была произведена обратная транскрипция и синтезирована кДНК. После этого проводили очистку продуктов реакции на магнитных частицах АМРиге ХР («Весктап Coulter», США). Далее к полученным фрагмен-

там кДНК были лигированы адаптеры, после чего библиотеки были баркодированы, амплифицированы и очищены на магнитных частицах. Все вышеперечисленные этапы были выполнены с помощью набора реагентов NEBNext Ultra II Directional RNA Library preparation kit for Illumina («New England Biolabs», Англия). Концентрацию библиотеки измеряли на флуориметре Qubit 3.0 («Invitrogen», США), качество библиотеки было проверено на Bioanalyser 2100 («Agilent technologies», США). Перед секвенированием количество молекул библиотеки было валидировано с помощью РВ-ПЦР при использовании 2,5× реакционной смеси для PCR-PB с EVA Green («Синтол», Россия) и праймеров для адаптеров Illumina («Евроген», Россия). Далее с учетом эффективной концентрации библиотека была разведена до 2 нМ и смешана в пул в соответствии с ожидаемой глубиной секвенирования. Секвенирование было выполнено на платформе HiSeq 2500 («Illumina», Германия) в режиме одноконцевых чтений длиной 57 п.н. с помощью набора HiSeq SR Cluster Kit v4 cBot и HiSeq SBS Kit V4 50 cycle kit («Illumina», Германия). Исходные данные доступны на ресурсе SRA ncbi.nlm.nih.gov/sra/ (номер проекта PRJNA529086). Результаты были обработаны при помощи программы Trimmomatic для обрезки чтений [33], программы STAR для картирования чтений на референсную последовательность человека (релиз GRCh38) [34] и алгоритма FeatureCounts для подсчета чтений для генов [35]. Вышеописанные расчеты были выполнены с помощью оборудования ЦКП «Геном» http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu\_genome\_c.php. Число прочтений в каждом образце было нормализовано с помощью алгоритма DESeq2 [36]. Значение корреляции определяли, как линейный коэффициент корреляции Пирсона (г-Пирсона). Для анализа дифференциальной экспрессии были выбраны гены, уровень мРНК которых изменялся в два и более раз. Для расчета обогащения функциональных групп дифференциально экспрессируемыми генами использовали сервис Metascape [37].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена *BRAF* с мутацией V600E в клетках Nthy-ori 3-1 активирует внутриклеточные сигнальные каскады RAS-RAF-MEK-ERK. Для исследования влияния фосфатазы SHP-2 на транскрипционную программу в опухолях щитовидной железы, содержащих онкогенную мутацию BRAF V600E, использовали ранее созданную нами клеточную линию, стабильно экспрессирующую онкоген BRAF V600E. Для ее создания была использована клеточная линия фолликулярного эпителия человека Nthy-ori 3-1, трансдуцированная лентивирусным конструктом LeGO iPuro2-BRAF V600E (см. раздел «Методы исследования»). Экспрессия лентивирусной мРНК, содержащей последовательность исследуемого онкогена, была подтверждена с помощью PB-ПЦР (рис. 1, a).

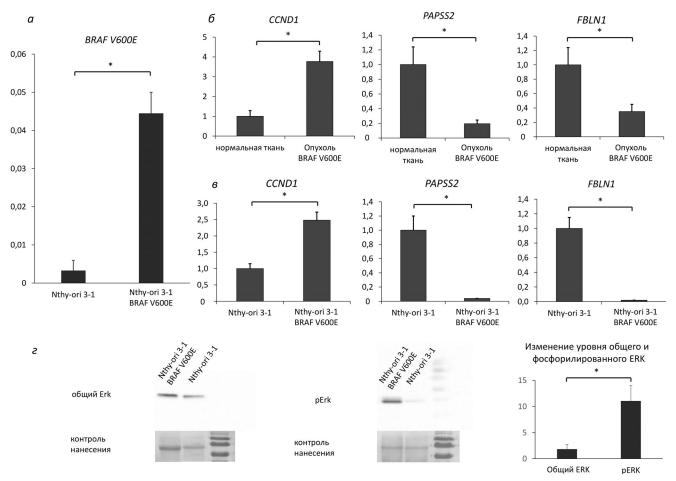
Полученную клеточную линию Nthy-ori/ BRAF V600E охарактеризовали с помощью анализа экспрессии ключевого эффектора МАРкиназного каскада и РІЗК-АКТ сигнального пути, гена циклина D1 (CCND1) [38-40], экспрессия которого активирована в BRAF V600E-coдержащих опухолях, а также анализа экспрессии 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат синтетазы 2 (PAPSS2) и фибулина 1 (FBLN1), экспрессия которых в опухолях ЩЖ с данной мутацией значительно снижена (по результатам анализа публично доступных данных транскриптомного профилирования [39] (рис. 1,  $\delta$ )). Нами было показано, что экспрессия мутантной формы BRAF V600E приводила к умеренному повышению экспрессии *CCND1* (примерно в 2–2,5 раза по сравнению с нетрансфецированными клетками), и к выраженному снижению экспрессии PAPSS2 и FBLN1 (рис. 1, в). Также было произведено измерение количества ключевого элемента MAPK-каскада, белка Erk1/2 (р44/42 МАРК) [41] и его фосфорилированной изоформы — pErk — в клеточных линиях Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E и показано, что в клеточной линии, содержащей мутацию V600E, количество фосфорилированного белка Erk (pErk) возрастает (рис.  $1, \varepsilon$ ).

Мы также провели сравнение полученных нами данных транскриптомного анализа клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E с аналогичными исследованиями, опубликованными ранее [42]. Корреляция транскриптомных данных, полученных для опубликованного ранее списка генов и созданной нами клеточной линии Nthy-ori/BRAF V600E, равна 0,76, что демонстрирует достаточно высокую степень схожести результатов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что созданная нами клеточная линия Nthy-ori/BRAF V600E, стабильно экспрессирующая онкоген BRAF V600E, демонстрирует все признаки онкоген-опосредуемого изменения транскрипционной программы клетки.

Подавление экспрессии гена *PTPN11* уменьшает экспрессию генов, участвующих в ОИС и активации сигнальных путей МАРК и Р13К-АКТ в клетках, экспрессирующих BRAF V600E. Для сравнения совместного и раздельного использования селективного ингибитора BRAF V600E и подавления экспрессии PTPN11 на экспрессионный профиль клеток эпителия щитовидной железы, содержащих мутацию BRAF V600E, был произведен нокдаун гена PTPN11 на клеточных линиях Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E с помощью малых интерферирующих РНК. Эффективность подавления экспрессии *PTPN11* была измерена с помощью метода количественной РВ-ПЦР в исследуемых клеточных линиях. Видно, что происходит существенное подавление экспрессии SHP-2 в случае обоих дериватов данной клеточной линий (рис. 2).

Для изучения возможной роли SHP-2 в модуляции ответа исследуемых клеток на вемурафениб мы провели анализ транскриптомов образцов с нормальной и подавленной экспрессией гена PTPN11, а также с воздействием вемурафениба и без него (результаты представлены в табл. S1 Приложения). В результате проведенного анализа были получены группы генов, регуляция которых в наибольшей степени менялась при данных воздействиях. В ответ на воздействие вемурафениба в клетках, экспрессирующих онкоген BRAF V600E, можно отметить выраженное изменение уровня мРНК генов, относящихся к группам «внеклеточный матрикс» (группы 1 и 3), «клеточный ответ на воздействие ионов кальция» (группа 4) и «ответ на ксеноби-



**Рис. 1.** *a* — Экспрессия лентивирусной мРНК, кодирующей онкоген BRAF V600E, нормализованная на уровень экспрессии GAPDH (ось ординат). По оси абсцисс указаны разные варианты исследуемых клеток, исходные клетки «Nthy-ori-3.1» и «Nthy-ori-3.1 BRAF V600E» клетки, экспрессирующие данный онкоген. Указаны средние значения по 3-м независимым измерениям  $\pm$  SEM. \* — Достоверные отличия между указанными значениями (p-значение < 0,05 по критерию Стьюдента).  $\hat{b}$  — Экспрессионный профиль генов *CCND1*, *PAPSS2*, *FBLN1* в нормальной ткани ЩЖ и опухоли ЩЖ, содержащей мутацию BRAF V600E, по данным транскриптомного анализа (GEO dataset ID – GSE27155 [37]). Приведены уровни экспрессии, нормированные на средние значения экспрессии соответствующих генов в нормальной ткани ЩЖ (ось ординат). Указаны средние значения для каждого типа опухоли  $\pm$  SEM. \* - Достоверные отличия между указанными значениями (p-значение < 0,05 по критерию Стьюдента). s — Экспрессионный профиль генов CCND1, PAPSS2, FBLN1 в нетрансфецированных клетках «Nthy-ori-3.1» и в клетках с оверэкспрессией исследуемого онкогена «Nthy-ori-3.1 BRAF V600E», по данным РВ-ПЦР (ось ординат). Нормализация на уровень экспрессии *GAPDH* и экспрессию мРНК соответствующего гена в нетрансфецированных клетках Nthy-огі-3.1. Указаны средние значения по 3-м независимым измерениям  $\pm$  SEM. \* — Достоверные отличия между указанными значениями (p-значение < 0.05 по критерию Стьюдента).  $\varepsilon$  — Вестерн-блот анализ фосфорилирования белка Erk1/2 (р44/42 MAPK). Справа показан результат анализа на фосфорилированный Erk1/2, слева — на общий. В обоих случаях приведен контроль нанесения (окраска мембраны красителем Понсо S). На графике указано относительное значение роста общего и фосфорилированного Erk1/2 в клетках, экспрессирующих BRAF V600E, относительно исходных клеток Nthy-ori-3.1. Средние значения по 3-м независимым измерениям ± SEM. — Достоверные отличия между указанными значениями (p-значение < 0.05 по критерию Стьюдента)

отики первой фазы» (группа 5) (рис. S1 a, в Приложении). Подавление экспрессии гена PTPN11 приводило к изменению экспрессии генов, относящихся к группам «хронический воспалительный процесс» (группа 2), «клеточный ответ на воздействие кортикостероидов» (группа 3) и «позитивная регуляция секреции IL8» (группа 4) (рис. S1 b, в Приложении). К сожалению, в образце с одновременным действием ве-

мурафениба и коротких интерферирующих РНК к гену *PTPN11* снижение уровня экспрессии последнего было недостаточным, чтобы в полной мере оценить влияние данных воздействий на транскриптом. В связи с этим на основании анализа других образцов был отобран ряд генов, задействованных в процессах клеточного роста, выживания и чувствительности к химиотерапии. Прежде всего, мы обратили внимание

на выраженное влияние подавления экспрессии гена *PTPN11* на экспрессию IL8, а также ряда других провоспалительных и ростовых факторов. Изменение уровня мРНК этих генов характерно для клеток, находящихся в состоянии онкоген-индуцированного старения [43]. Кроме того, данное воздействие привело к изменению экспрессии ряда ключевых факторов развития OИС (IL8, p15, p16, p21 и IGFBP7). Так фактор р21 способен осуществлять остановку клеточного цикла в двух фазах (G1 и G2) за счет ингибирования циклин-зависимой киназы 1А [41, 42]. Фактор p16 оказывает воздействие через сигнальный путь pRb, подавляя действие циклин-зависимых киназ, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1 [44], а фактор р15 реализует остановку пролиферации через путь TGF-β, его мишенями также являются циклин-зависимые киназы (CDK4 и CDK6) [45]. В свою очередь, для белка IGFBP7 показана ключевая роль BRAF в ингибировании сигнального пути BRAF-MEK-ERK и активации программы ОИС в невусе, содержащем мутацию V600E гена BRAF [46].

Таким образом, в результате анализа транскриптома было обнаружено изменение экспрессии этих генов, а также других, непосредственно задействованных в регуляции пролиферации и выживания клеток. Верификация изменения экспрессии ряда генов, задействованных в данных процессах, была проведена с помощью количественной РВ-ПЦР в нескольких дополнительных экспериментах (рис. 3).

Согласно полученным данным, экспрессия ряда факторов участвующих в развитии онкогениндуцируемого старения (*p15*, *p16*, *p21* и *IGFBP7*) повышена в клеточной линии Nthy-ori 3-1/ BRAF V600E по сравнению с исходными иммортализированными клетками фолликулярного эпителия ЩЖ (линия Nthy-ori 3-1) (рис. 3). Также экспрессия онкогена BRAF V600E приводит к повышению уровня РНК, кодирующих белки IL6, IL8 и VEGFA, повышенная секреция которых характерна для клеток, находящихся в состоянии ОИС [43] (рис. S2 в Приложении). Это говорит в пользу нашего предположения о том, что экспрессия данных генов вызвана наличием в клетке онкогена BRAF V600E. Также было показано, что нокдаун гена PTPN11 значительно уменьшает экспрессию регуляторов ОИС (*RB1*, *P15*, *p16*, *p21* и *IGFBP7*) и генов ОИС-ассоциированного секреторного профиля (IL6, IL8 и VEGFA), приближая их экспрессию в клетках Nthy-ori 3-1/BRAF V600E к уровню в исходных клетках (рис. 3 и рис. S2 в Приложении). Исходя из этих данных, можно предположить, что тирозинфосфатаза SHP-2 функционирует как важный элемент регуляции ОИС. Любопытно, что добавление селективного ингибитора BRAF V600E — вемурафениба — само по себе повышает экспрессию генов p15 и p16 даже в клетках, не содержащих онкоген, однако этот эффект также пропадает в случае нокдауна PTPN11 (рис. 3).

Также мы показали, что введение мутации BRAF V600E увеличивает экспрессию ряда генов, участвующих в активации сигнальных путей МАРК и Р13К-АКТ при агрессивном фенотипе опухоли: *Notch4* [44], *MAPK3* (ERK1), MEK1, а также многих представителей семейства циклинов (гены *CCNB2*, *CCNC* и *CCNA1*). Также было отмечено увеличение экспрессии негативного регулятора гиперактивации BRAF – DUSP6 [45, 46]. Стоит отметить, что для вышеперечисленных генов использование вемурафениба зачастую усиливало эффект введения онкогена BRAF V600E, который затем нивелировался при подавлении PTPN11 (гены Notch4, *CCNA1*, *DUSP6* и др.). Известно, что гены *Notch4* и *CCNA1* участвуют в развитии лекарственной устойчивости при лечении рака груди [47] и рака яичников [48]. Также известно, что при повышении уровня экспрессии CCNA1 повышается

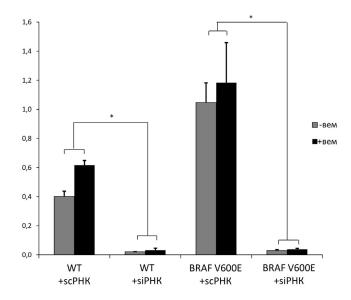
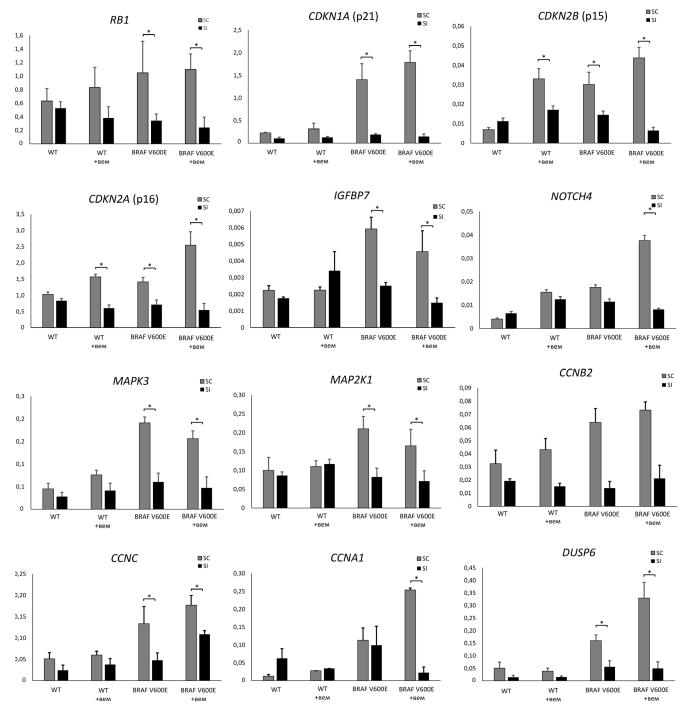


Рис. 2. Подавление экспрессии гена *PTPN11* с помощью малых интерферирующих PHK в нетрансфецированных клетках «WT» и в клетках с оверэкспрессией исследуемого онкогена «BRAF V600E», подвергнутых обработке вемурафениба (+вем) и без обработки. Клетки, обработанные миРНК к гену *PTPN11*, обозначены «SI»; клетки, обработанные контрольными PHK, обозначены «SC». Приведен относительный уровень экспрессии гена, нормализованного на экспрессию гена *GAPDH* (ось ординат). Указаны средние значения по двум независимым экспериментам ± SEM. \* — Достоверное отличие от образца, трансфецированного контрольными (scrambled) scPHK (*p*-значение < 0,05 по критерию Стьюдента)



**Рис. 3.** Относительный уровень экспрессии ряда генов после подавления экспрессии гена *PTPN11* с помощью миРНК и/или селективного ингибирования BRAF V600E с использованием вемурафениба. По оси абсцисс указаны разные варианты исследуемых клеток, исходные клетки «WT» и клетки, экспрессирующие исследуемый онкоген «BRAF V600E», необработанные или обработанные вемурафенибом (+вем). Клетки, обработанные миРНК к гену *PTPN11*, обозначены «SI», клетки, обработанные контрольными РНК, обозначены «SC». Приведены уровни экспрессии генов, нормализованные на экспрессию гена *GAPDH* (ось ординат). \* — Означает достоверное отличие от образца, трансфецированного контрольными (scrambled) РНК (scRNA) (*p*-значение < 0,05 по критерию Стьюдента)

частота развития острого лимфобластного лейкоза в мышиной модели [49], а высокий уровень экспрессии *CCNB2* и *CCNC* может наблюдаться при развитии различных опухолей: колорек-

тальной аденокарциноме, раке молочной железы [50] и аденоме гипофиза [51]. Подавление экспрессии гена *PTPN11* приводит к снижению влияния BRAF V600E на экспрессию генов цик-

линов CCNA1, CCNB2 и CCNC и гена *Notch4*, что указывает на неоднозначную роль фосфотазы SHP-2 в развитии опухолей с мутацией BRAF V600 F.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушение пути передачи сигналов RAS/ RAF/MEK/ERK характерно для многих типов человеческих опухолей. Система контроля активности компонентов МАРК-каскада строится на негативной обратной связи между самими компонентами каскада. При нормальной активации данного каскада последовательно активируется ряд его элементов, однако при появлении конститутивно активного участника каскада (например, BRAF V600E) или при ингибировании какого-то элемента каскада механизмы обратной связи могут соответственно блокировать или реактивировать прохождение сигнала по каскаду. Мы предполагаем, что SHP-2 может играть важную роль в подобной регуляции данного каскада: с одной стороны, участвовать в реактивации пролиферации в случае ингибирования определенных элементов, а с другой стороны, подавлять деление клеток, экспрессирующих конститутивноактивный компонент каскада. Так было показано, что единичное терапевтическое ингибирование одного компонента МАРК-каскада при опухолях различной этиологии (например, МЕК или RAF) приводит к повышению экспрессии различных рецепторных тирозинкиназ и, как следствие, возникновению адаптивной устойчивости опухоли к ингибитору [52-55]. Однако комбинация ингибиторов против SHP-2 и ALK или MEK позволяет эффективно подавлять рост опухолевых клеток с нарушенной регуляцией ALK [56] и RAS [57]. Полученные нами данные о роли SHP-2 в регуляции транскрипции генов (Notch4, CCNA1), связанных с активацией опухолевого роста в ответ на экспрессию онкогена BRAF V600E в присутствии вемурафениба, также указывают на способность SHP-2 участвовать в реактивации регуляции пролиферации клеток в ответ на

подавление компонентов каскада RAS/RAF/MEK/ERK. С другой стороны, согласно полученным нами данным фосфатаза SHP-2 играет важную роль в активации транскрипции факторов p15, p16, p21, RB1 и IGFBP7, участвующих в ОИС, вызванной экспрессией BRAF V600E, причем вемурафениб может удваивать ингибирующий эффект от подавления экспрессии PTPN11 в случае генов p15 и IGFBP7.

Таким образом, согласно нашему предположению, фосфатаза SHP-2 может играть важную роль в регуляции МАРК-каскада и как фактор, передающий сигнал от EGFR, HER2 и др., и как важный фактор, участвующий в негативной регуляции каскада при нарушении его работы. Этим может объясняться двоякое влияние данной фосфатазы на процессы онкогенеза в зависимости от наличия или отсутствия мутаций компонентов МАРК-каскада и компонентов ОИС, а также в зависимости от используемой терапии. Данные, представленные в этой статье, указывают на возможные неоднозначные последствия подавления SHP-2 в клетках конститутивно-активных участников каскада RAS/ RAF/MEK/ERK. С одной стороны, блокировка данной фосфатазы позволяет предотвращать реактивацию пролиферации клеток в ответ на использование ингибиторов отдельных компонентов каскада, с другой - подавление SHP-2 может привести к активации пролиферации клеток из-за нарушения ОИС.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-315-00171 мол\_а; лентивирусный вектор, содержащий ген BRAF V600E и данные для рис. 1, получены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10423).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.M., and Kohn, E.C. (2014) The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective, *Cancer*, 120, 3446–3456, doi: 10.1002/cncr.28864.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*, 417, 949–954, doi: 10.1038/nature00766.
- 3. Mesa, C. Jr., Mirza, M., Mitsutake, N., Sartor, M., Medvedovic, M., Tomlinson, C., Knauf, J.A., Weber, G.F., and Fagin, J.A. (2006) Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling, *Cancer Res.*, 66, 6521–6529, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0739.

- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011) Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma, *J. Clin. Oncol.*, 29, 1239–1246, doi: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
- Loh, M.L., Vattikuti, S., Schubbert, S., Reynolds, M.G., Carlson, E., Lieuw, K.H., Cheng, J.W., Lee, C.M., Stokoe, D., Bonifas, J.M., Curtiss, N.P., Gotlib, J., Meshinchi, S., Le Beau, M.M., Emanuel, P.D., and Shannon, K.M. (2004) Mutations in *PTPN11* implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis, *Blood*, 103, 2325–2331, doi: 10.1182/ blood-2003-09-3287.
- Mohi, M.G., Williams, I.R., Dearolf, C.R., Chan, G., Kutok, J.L., Cohen, S., Morgan, K., Boulton, C., Shigematsu, H., Keilhack, H., Akashi, K., Gilliland, D.G., and Neel, B.G. (2005) Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (*PTPN11*) mutations, *Cancer Cell*, 7, 179–191, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.010.
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S., and Gelb, B.D. (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, Nat. Genet., 29, 465–468, doi: 10.1038/ng772.
- 8. Chan, G., Kalaitzidis, D., and Neel, B.G. (2008) The tyrosine phosphatase Shp2 (*PTPN11*) in cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 179–192, doi: 10.1007/s10555-008-9126-y.
- 9. Chan, R.J., and Feng, G.S. (2007) *PTPN11* is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase, *Blood*, **109**, 862–867, doi: 10.1182/blood-2006-07-028829.
- Li, S.M. (2016) Биологические функции SHP2 при заболеваниях человека, *Мол. Биол. (Москва)*, 50, 27–33, doi: 10.7868/S0026898416010110.
- Matozaki, T., Murata, Y., Saito, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. (2009) Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation, *Cancer Sci.*, 100, 1786–1793, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01257.x.
- Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002) Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2, Mol. Cell. Biol., 22, 4062–4072.
- Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., and Pawson, T. (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2, *EMBO J.*, 16, 2352–2364, doi: 10.1093/emboj/16.9.2352.
- Tajan, M., Batut, A., Cadoudal, T., Deleruyelle, S., Le, Gonidec, S., Saint Laurent, C., Vomscheid, M., Wanecq, E., Treguer, K., De Rocca Serra-Nedelec, A., Vinel, C., Marques, M.A., Pozzo, J., Kunduzova, O., Salles, J.P., Tauber, M., Raynal, P., Cave, H., Edouard, T., Valet, P., and Yart, A. (2014) LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from dietinduced obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E4494—E4503, doi: 10.1073/pnas.1406107111.
- Chen, L., Chen, W., Mysliwski, M., Serio, J., Ropa, J., Abulwerdi, F.A., Chan, R.J., Patel, J.P., Tallman, M.S., Paietta, E., Melnick, A., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O., Nikolovska-Coleska, Z., and Muntean, A.G. (2015) Mutated *Ptpn11* alters leukemic stem cell frequency and reduces the sensitivity of acute myeloid leukemia cells to Mcl1 inhibition, *Leukemia*, 29, 1290–1300, doi: 10.1038/leu.2015.18.

- Qu, C.K., Shi, Z.Q., Shen, R., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., and Feng, G.S. (1997) A deletion mutation in the SH2-N domain of Shp-2 severely suppresses hematopoietic cell development, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 5499–5507.
- development, Mol. Cell. Biol., 17, 5499-5507.
  17. Bard-Chapeau, E.A., Li, S., Ding, J., Zhang, S.S., Zhu, H.H., Princen, F., Fang, D.D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., Varki, N.M., Wang, H., and Feng, G.S. (2011) Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis, Cancer Cell, 19, 629-639, doi: 10.1016/j.ccr.2011.03.023.
- Yang, W., Wang, J., Moore, D.C., Liang, H., Dooner, M., Wu, Q., Terek, R., Chen, Q., Ehrlich, M.G., Quesenberry, P.J., and Neel, B.G. (2013) *Ptpn11* deletion in a novel progenitor causes metachondromatosis by inducing hedgehog signalling, *Nature*, 499, 491–495, doi: 10.1038/nature12396.
- Hill, K.S., Roberts, E.R., Wang, X., Marin, E., Park, T.D., Son, S., Ren, Y., Fang, B., Yoder, S., Kim, S., Wan, L., Sarnaik, A.A., Koomen, J.M., Messina, J.L., Teer, J.K., Kim, Y., Wu, J., Chalfant, C.E., and Kim, M. (2019) *PTPN11* plays oncogenic roles and is a therapeutic target for *BRAF* wild-type melanomas, *Mol. Cancer Res.*, 17, 583–593, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0777.
- Zhan, Y., Counelis, G.J., and O'Rourke, D.M. (2009) The protein tyrosine phosphatase SHP-2 is required for EGFRvIII oncogenic transformation in human glioblastoma cells, *Exp. Cell Res.*, 315, 2343–2357, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.05.001.
- 21. Hu, Z.Q., Ma, R., Zhang, C.M., Li, J., Li, L., Hu, Z.T., Gao, Q.I., and Li, W.M. (2015) Expression and clinical significance of tyrosine phosphatase SHP2 in thyroid carcinoma, *Oncol. Lett.*, **10**, 1507–1512, doi: 10.3892/ol.2015.3479.
- Prahallad, A., Heynen, G.J., Germano, G., Willems, S.M., Evers, B., Vecchione, L., Gambino, V., Lieftink, C., Beijersbergen, R.L., Di Nicolantonio, F., Bardelli, A., and Bernards, R. (2015) PTPN11 is a central node in intrinsic and acquired resistance to targeted cancer drugs, *Cell Rep.*, 12, 1978–1985, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.037.
- Schneeberger, V.E., Ren, Y., Luetteke, N., Huang, Q., Chen, L., Lawrence, H.R., Lawrence, N.J., Haura, E.B., Koomen, J.M., Coppola, D., and Wu, J. (2015) Inhibition of Shp2 suppresses mutant EGFR-induced lung tumors in transgenic mouse model of lung adenocarcinoma, Oncotarget, 6, 6191–6202, doi: 10.18632/oncotarget.3356.
- Chen, Y.N., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., et al. (2016) Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases, *Nature*, 535, 148–152, doi: 10.1038/ nature18621.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., et al. (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N. Engl. J. Med.*, 364, 2507–2516, doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
- J. Med., 364, 2507–2516, doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
  26. Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J.M., Knauf, J.A., Viale, A., Sherman, E.J., Ryder, M., Ghossein, R.A., Rosen, N., and Fagin, J.A. (2013) Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas, Cancer Discov., 3, 520–533, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0531.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., Chodon, T., Nelson, S.F., McArthur, G., Sosman, J.A., Ribas, A., and Lo, R.S. (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature*, 468, 973–977, doi: 10.1038/nature09626.
- Boehm, J.S., Zhao, J.J., Yao, J., Kim, S.Y., Firestein, R., Dunn, I.F., Sjostrom, S.K., Garraway, L.A., Weremowicz, S.,

- Richardson, A.L., Greulich, H., Stewart, C.J., Mulvey, L.A., Shen, R.R., Ambrogio, L., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E., Vidal, M., Meyerson, M., Grenier, J.K., Hinkle, G., Root, D.E., Roberts, T.M., Lander, E.S., Polyak, K., and Hahn, W.C. (2007) Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene, *Cell*, **129**, 1065–1079, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.052.
- Prokofjeva, M.M., Proshkina, G.M., Lebedev, T.D., Shulgin, A.A., Spirin, P.V., Prassolov, V.S., and Deyev, S.M. (2017) Lentiviral gene delivery to plasmolipin-expressing cells using Mus caroli endogenous retrovirus envelope protein, *Biochimie*, 142, 226–233, doi: 10.1016/j.biochi. 2017.09.004.
- Liu, Z., Zhao, Y., Fang, J., Cui, R., Xiao, Y., and Xu, Q. (2017) SHP2 negatively regulates HLA-ABC and PD-L1 expression via STAT1 phosphorylation in prostate cancer cells, *Oncotarget*, 8, 53518–53530, doi: 10.18632/oncotarget. 18591.
- Schwartz, A.M., Putlyaeva, L.V., Covich, M., Klepikova, A.V., Akulich, K.A., Vorontsov, I.E., Korneev, K.V., Dmitriev, S.E., Polanovsky, O.L., Sidorenko, S.P., Kulakovskiy, I.V., and Kuprash, D.V. (2016) Early B-cell factor 1 (EBF1) is critical for transcriptional control of SLAMF1 gene in human B cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1859, 1259–1268, doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.07.004.
- Afanasyeva, M.A., Britanova, L.V., Korneev, K.V., Mitkin, N.A., Kuchmiy, A.A., and Kuprash, D.V. (2014) Clusterin is a potential lymphotoxin beta receptor target that is upregulated and accumulates in germinal centers of mouse spleen during immune response, *PLoS One*, 9, e98349, doi: 10.1371/journal.pone.0098349.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, 30, 2114–2120, doi: 10.1093/bioinformatics/ btu170.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, 29, 15–21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- 35. Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923–930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, 15, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets, *Nat. Commun.*, 10, 1523, doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
- Castellone, M.D., De Falco, V., Rao, D.M., Bellelli, R., Muthu, M., Basolo, F., Fusco, A., Gutkind, J.S., and Santoro, M. (2009) The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation, *Cancer Res.*, 69, 1867–1876, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1982.
- 39. Giordano, T.J., Kuick, R., Thomas, D.G., Misek, D.E., Vinco, M., Sanders, D., Zhu, Z., Ciampi, R., Roh, M., Shedden, K., Gauger, P., Doherty, G., Thompson, N.W., Hanash, S., Koenig, R.J., and Nikiforov, Y.E. (2005) Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis, *Oncogene*, 24, 6646–6656, doi: 10.1038/sj.onc.1208822.
- 40. Nucera, C., Porrello, A., Antonello, Ž.A., Mekel, M., Nehs, M.A., Giordano, T.J., Gerald, D., Benjamin, L.E.,

- Priolo, C., Puxeddu, E., Finn, S., Jarzab, B., Hodin, R.A., Pontecorvi, A., Nose, V., Lawler, J., and Parangi, S. (2010) B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10649–10654, doi: 10.1073/pnas.1004934107.
- 41. Roskoski, R. Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.*, **66**, 105–143, doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- 42. Kim, B.A., Jee, H.G., Yi, J.W., Kim, S.J., Chai, Y.J., Choi, J.Y., and Lee, K.E. (2017) Expression profiling of a human thyroid cell line stably expressing the BRAFV600E mutation, *Cancer Genom. Proteomics*, **14**, 53–67, doi: 10.21873/cgp.20018.
- 43. Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.*, 5, 99–118, doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- Hardy, K.M., Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Margaryan, N.V., Postovit, L.M., Strizzi, L., and Hendrix, M.J. (2010) Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype, *Cancer Res.*, 70, 10340–10350, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0705.
- 5472.CAN-10-0705.
  45. Kim, Y.H., Choi, Y.W., Han, J.H., Lee, J., Soh, E.Y., Park, S.H., Kim, J.H., and Park, T.J. (2014) TSH signaling overcomes B-RafV600E-induced senescence in papillary thyroid carcinogenesis through regulation of DUSP6, *Neoplasia*, **16**, 1107–1120, doi: 10.1016/j.neo.2014. 10.005.
- 46. Moulana, F.I., Priyani, A.A.H., de Silva, M.V.C., and Dassanayake, R.S. (2018) BRAF-oncogene-induced senescence and the role of thyroid-stimulating hormone signaling in the progression of papillary thyroid carcinoma, *Horm. Cancer*, 9, 1–11, doi: 10.1007/s12672-017-0315-4.
- 47. Simões, B.M., O'Brien, C.S., Eyre, R., Silva, A., Yu, L., Sarmiento-Castro, A., Alferez, D.G., Spence, K., Santiago-Gomez, A., Chemi, F., Acar, A., Gandhi, A., Howell, A., Brennan, K., Ryden, L., Catalano, S., et al. (2015) Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH4-dependent cancer stem cell activity, *Cell Rep.*, 12, 1968–1977, doi: 10.1016/j.celrep. 2015.08.050.
- 48. Huang, K.C., Yang, J., Ng, M.C., Ng, S.K., Welch, W.R., Muto, M.G., Berkowitz, R.S., and Ng, S.W. (2016) Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells, *Eur. J. Cancer*, **67**, 152–163, doi: 10.1016/j.ejca.2016.08.007.
- Liao, C., Wang, X.Y., Wei, H.Q., Li, S.Q., Merghoub, T., Pandolfi, P.P., and Wolgemuth, D.J. (2001) Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 6853–6858, doi: 10.1073/ pnas.121540098.
- Valladares, A., Hernandez, N.G., Gomez, F.S., Curiel-Quezada, E., Madrigal-Bujaidar, E., Vergara, M.D., Martinez, M.S., and Arenas Aranda, D.J. (2006) Genetic expression profiles and chromosomal alterations in sporadic breast cancer in Mexican women, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 170, 147–151, doi: 10.1016/j.cancergencyto. 2006.06.002.
- 51. Takashima, S., Saito, H., Takahashi, N., Imai, K., Kudo, S., Atari, M., Saito, Y., Motoyama, S., and Minamiya, Y. (2014) Strong expression of cyclin B2 mRNA correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer, *Tumour Biol.*, 35, 4257–4265, doi: 10.1007/s13277-013-1556-7.
- 52. Ahmed, T.A., Adamopoulos, C., Karoulia, Z., Wu, X., Sachidanandam, R., Aaronson, S.A., and Poulikakos, P.I. (2019) SHP2 Drives adaptive resistance to ERK signaling

- inhibition in molecularly defined subsets of ERK-dependent tumors, *Cell Rep.*, **26**, 65–78 e65, doi: 10.1016/j.celrep. 2018.12.013.
- Corcoran, R.B., Ebi, H., Turke, A.B., Coffee, E.M., Nishino, M., Cogdill, A.P., Brown, R.D., Della Pelle, P., Dias-Santagata, D., Hung, K.E., Flaherty, K.T., Piris, A., Wargo, J.A., Settleman, J., Mino-Kenudson, M., and Engelman, J.A. (2012) EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib, *Cancer Discov.*, 2, 227–235, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0341.
- 54. Duncan, J.S., Whittle, M.C., Nakamura, K., Abell, A.N., Midland, A.A., Zawistowski, J.S., Johnson, N.L., Granger, D.A., Jordan, N.V., Darr, D.B., Usary, J., Kuan, P.F., Smalley, D.M., Major, B., He, X., Hoadley, K.A., Zhou, B., Sharpless, N.E., Perou, C.M., Kim, W.Y., Gomez, S.M., Chen, X., Jin, J., Frye, S.V., Earp, H.S., Graves, L.M., and Johnson, G.L. (2012) Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK

- inhibition in triple-negative breast cancer, *Cell*, **149**, 307–321, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.053.
- Karoulia, Z., Wu, Y., Ahmed, T.A., Xin, Q., Bollard, J., Krepler, C., Wu, X., Zhang, C., Bollag, G., Herlyn, M., Fagin, J.A., Lujambio, A., Gavathiotis, E., and Poulikakos, P.I. (2016) An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling, Cancer Cell, 30, 485–498, doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.024.
- Dardaei, L., Wang, H.Q., Singh, M., Fordjour, P., Shaw, K.X., et al. (2018) SHP2 inhibition restores sensitivity in ALKrearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors, *Nat. Med.*, 24, 512–517, doi: 10.1038/nm.4497.
- 57. Mainardi, S., Mulero-Sanchez, A., Prahallad, A., Germano, G., Bosma, A., Krimpenfort, P., Lieftink, C., Steinberg, J.D., de Wit, N., Goncalves-Ribeiro, S., Nadal, E., Bardelli, A., Villanueva, A., and Bernards, R. (2018) SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer *in vivo*, *Nat. Med.*, **24**, 961–967, doi: 10.1038/s41591-018-0023-9.

## PTPN11 KNOCKDOWN PREVENTS CHANGES IN THE EXPRESSION OF GENES CONTROLLING CELL CYCLE, CHEMOTHERAPY RESISTANCE, AND ONCOGENE-INDUCED SENESCENCE IN HUMAN THYROID CELLS OVEREXPRESSING BRAF V600E ONCOGENIC PROTEIN\*,\*\*

L. V. Putlyaeva<sup>1,2</sup>, D. E. Demin<sup>1,3</sup>, A. N. Uvarova<sup>1,4</sup>, L. S. Zinevich<sup>5</sup>, M. M. Prokofjeva<sup>1</sup>, G. R. Gazizova<sup>6</sup>, E. I. Shagimardanova<sup>6</sup>, and A. M. Schwartz<sup>1\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: shvarec@yandex.ru

<sup>2</sup> Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudnyi, Moscow Region, Russia

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia

Received September 21, 2019 Revised September 21, 2019 Accepted October 20, 2019

The MAPK (RAS/BRAF/MEK/ERK) signaling pathway is a kinase cascade involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, and survival in response to external stimuli. The V600E mutation in the *BRAF* gene has been detected in various tumors, resulting in a 500-fold increase in the BRAF kinase activity. However, monotherapy with selective BRAF V600E inhibitors often leads to the reactivation of MAPK signaling cascade and emergence of drug resistance. Therefore, new targets are being developed for the inhibition of components of the aberrantly activated cascade. It was recently discovered that resistance to the BRAF V600E inhibitors may be associated with the activity of the tyrosine phosphatase SHP-2 encoded by the *PTPN11* gene. In this paper, we analyzed transcriptional effects of the *PTPN11* gene knockdown and selective suppression of BRAF V600E in a model of thyroid follicular epithelium. We found that the siRNA-mediated knockdown of *PTPN11* after vemurafenib treatment prevented an increase in the expression of *CCNA1* and *NOTCH4* genes involved in the formation of drug resistance of tumors. On the other hand, downregulation of *PTPN11* expression blocked the transcriptional activation of genes (*p21*, *p15*, *p16*, and *IGFBP7*) involved in the cell cycle regulation and oncogene-induced senescence in response to the BRAF V600E expression. Therefore, it can be assumed that SHP-2 participates not only in the drug resistance emergence in cancer cells, but also in the oncogene-induced cell senescence.

Keywords: SHP-2, BRAF V600E, thyroid tumor, oncogene-induced senescence

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia

УДК 611.018.51

#### ЭТАНОЛЬНЫЙ ЭКСТРАКТ ОБОЛОЧКИ СЕМЯН ТАМАРИНДА ЭФФЕКТИВНО ЗАЩИЩАЕТ ЭРИТРОЦИТЫ ОТ ЭРИПТОЗА, ВЫЗВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

© 2020 Дж. Кенгайя<sup>1</sup>, С.К.М. Нандиш<sup>1</sup>, Ч. Рамачандрайя<sup>1</sup>, Чандрама<sup>1</sup>, А. Шивайя<sup>1</sup>, Дж.Дж. Вишалакши<sup>2</sup>, М. Поль<sup>2</sup>, С.М. Сантош<sup>3</sup>, Р.Л. Шанкар<sup>4</sup>, Д. Саннанингайя<sup>1\*</sup>

Поступила в редакцию 01.04.2019 После доработки 04.10.2019 Принята к публикации 17.10.2019

Апоптоз или запрограммированная гибель эритроцитов — это ключевой момент в выявлении анемии при различных патологических состояниях, включая сахарный диабет, хронические заболевания почек (ХБП), рак, сепсис и др. Окислительный стресс, важный триггер в процессе ускоренной гибели эритроцитов при эриптозе, является основным механизмом, лежащим в основе возникновения анемических состояний при вышеуказанных патологиях. Поэтому выявление антиоксидантных и антиэриптотических средств для лечения связанных со стрессом заболеваний сегодня является все более востребованным. В настоящей работе продемонстрированы антиоксидантные и антиэриптотические свойства этанольного экстракта оболочки семян тамаринда (TSCEE), действующие против индуцированного ААРН (2,2' азобис (2-амидинопропан гидрохлорид)) окислительного стресса и эриптоза. Присутствие вероятных вторичных метаболитов в экстракте TSCEE исследовали с помощью колоночной хроматографии RP-HPLC. Активные функциональные группы, присутствующие в экстракте, были изучены с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR). Циклические вольтамперометрические исследования подтвердили антиоксидантный потенциал препарата. Кроме того, способность экстракта TSCEE защищать эритроциты была подтверждена при оценке маркеров эриптоза, таких как активные формы кислорода (АФК), внутриклеточный уровень кальция и экстернализация фосфатидилсерина. Также было показано, что экстракт TSCEE понижал уровень перекисного окисления липидов, содержание карбонильных групп в белках, восстанавливал внутриклеточный уровень глутатиона (GSH), способствовал активации антиоксидантных ферментов и ферментов, участвующих в восстановлении пула GSH. В заключение следует отметить, что TSCEE имеет обширное терапевтическое применение, поэтому он может быть перспективным терапевтическим агентом для лечения эриптоза, индуцированного окислительным стрессом, и следующей за этим анемии при различных патологиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанольный экстракт оболочки семени тамаринда (TSCEE – Tamarind Seed Coat Ethanol Extract), активные формы кислорода (AФK), эриптоз, (GSH/GSSG), G6PDH, антиоксидант, AAPH. **DOI:** 10.31857/S032097252001011X

Эритроциты — это наиболее уникальные клеточные компоненты, присутствующие в кровотоке, они являются основным средством снабжения кислородом и удаления углекислого газа из тканей через газообмен в легких. Каж-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ААРН — 2,2′ азобис (2-амидинопропан гидрохлорид); GSH — восстановленный глутатион; GSH — окисленный глутатион; GRdх — глутатионредуктаза; GPх — глутатионпероксидаза; GST — глутатион-S-трансфераза; МеtHb — метгемоглобин; СОД — супероксиддисмутаза; САТ — каталаза; ФС — фосфатидилсерин; ХБП — хронические болезни печени.

дый день у здоровых взрослых людей появляются ~200 миллионов эритроцитов, и их продолжительность жизни составляет 120 дней. Цитокин под названием эритропоэтин, образующийся в почках, заставляет гемопоэтические стволовые клетки из костного мозга проходить ряд стадий дифференцировки, чтобы сформировать зрелые эритроциты, которые характеризуются отсутствием митохондрий и ядра [1, 2]. Будучи клетками, несущими кислород, эритроциты более подвержены окислительному повреждению. Некоторые аспекты, такие как непрерывное воздействие кислорода, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в их липид-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India

Department of Studies in Biochemistry, University of Mysore, Manasagangothry, 570006 Mysore, India
 Department of Medical Biochemistry and Microbiology (IMBM) Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden
 Department of Sericulture, Yuvaraja's College, University of Mysore, 570006 Mysore, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.

ном бислое и автоокисление гемоглобина, приводящее к деградации гема, делают циркулирующие эритроциты восприимчивыми к окислительному повреждению [3]. В нормальных условиях эритроциты хорошо снабжены антиоксидантными молекулами и детоксицирующими ферментами для борьбы с окислительным стрессом. Однако сообщалось, что при некоторых патологических состояниях, включая диабет, рак и хронические заболевания почек (ХБП), наблюдали повреждение эритроцитов в результате окислительного стресса. В настоящее время показано, что терапевтические препараты, используемые для лечения этих патологических состояний, управляют окислительным стрессом, вызывая повреждение эритроцитов. Избыточный окислительный стресс вызывает как лизис эритроцитов [4], так их старение и гибель от эриптоза. Эриптоз — это суицидальная гибель эритроцитов, которая характеризуется сморщиванием клеток и скремблированием рассматриваемыми как признаки апоптоза [5]. Таким образом, устойчивый окислительный стресс может изменить параметры крови за счет снижения количества эритроцитов и, наконец, может привести к тяжелым анемическим состояниям. Анемия вызывает гипоксию в различных органах, а симптомы анемии включают расстройство желудка, нарушение когнитивных функций, депрессию, сердечно-сосудистые осложнения, головокружение и одышку при физической нагрузке. Кроме того, у пациентов, страдающих раком, ХБП и сердечно-сосудистыми осложнениями, окислительный стресс, вызванный анемией, является наиболее распространенной проблемой [6]. Антиоксидантная терапевтическая стратегия помогает в более эффективном управлении вышеуказанной проблемой, чтобы преодолеть эти вторичные побочные эффекты при различных патологиях. Лекарственное растение тамаринд – источник богатый антиоксидантными молекулами - является предпочтительным выбором для терапии. Тамаринд индийский или индийский финик (Tamarindus indica L) относится к семейству Fabaceae и подсемейству Caesalpiniodeae. Хотя родиной этого тропического дерева является Африка, оно широко представлено в мире. Т. Indica является стручком и, подобно фруктам, имеет съедобную часть и семена. Съедобная часть используется в ресторанах и традиционной медицине по всему миру. В то же время семенная оболочка (TSCEE), содержит множество фитохимических веществ, главным образом полифенолов, алкалоидов, флавоноидов, тритерпенов и полисахаридов, используемых при лечении различных патофизиологических состояний человека [7]. Несмотря на огромное терапевтическое применение оболочки семян тамаринда его способность защищать эритроциты не была исследована. Таким образом, в настоящей работе показана эффективность защиты эритроцитов с помощью TSCEE против AAPH-индуцированного окислительного стресса.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Химические соединения и реактивы. 2,2′ азобис (2-амидинопропан гидрохлорид) (ААРН); 2′,7′-дихлородигидрофлуоресцеин (DCFDA); Fura-2AM, меченый аннексин V-FITC; HEPES [4-(2-гидроксиэтил)-1 пиперазин этансульфоновая кислота]; тиобарбитуровая кислота (ТВА); 1,1′,3,3′-тетраметоксипропан (ТМР); восстановленный глутатион (GSH); окисленный глутатион (GSSG); О-фталевый альдегид; 1-хлор-2,4-динитробензол (CDNB) и кальцеин были приобретены у фирмы «Sigma», США. Все остальные реактивы были аналитической чистоты.

Растительный материал и получение экстракта оболочки семени тамаринда. Семена тамаринда были приобретены на местном рынке в городе Тумкур. Семена были тщательно помыты и высущены при комнатной температуре в течение 24 ч, после этого высушенные семена прогревали при температуре 50 °С в течение 15 мин, семенные оболочки механически отделяли, гомогенизировали, перетирая пестиком в ступке, добавляя 95% этанол. Полученный этанольный экстракт фильтровали через фильтровальную бумагу Ватман № 1 и выпаривали спирт. Полученный фильтрат полностью растворяли в воде и использовали для проведения дальнейшего анализа.

Анализ растительных компонентов экстракта TSCEE с помощью прибора HPLC-PDA. Растительные компоненты экстракта TSCEE определяли при помощи HPLC-PDA («Waters Corporation», США). Примерно 20 мкл образца TSCEE наносили на колонку  $C_{18}$  (150 мм × 4,60 мм, размер частиц 5 мкм). Колонку предварительно уравновешивали 10%-м ацетонитрилом в воде для HPLC. Образец элюировали с использованием линейного градиента воды для HPLC и ацетонитрила (растворители A и B, 9 : 1  $\nu/\nu$ ). Скорость потока составляла 1 мл/мин, и образец сканировали при различных длинах волн в лиапазоне 200—800 нм.

Инфракрасная спектрофотометрия с преобразованием Фурье (FT-IR — Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) и определение антиоксидантной активности экстракта TSCEE с помощью циклической вольтамперометрии. Измерения спектров FT-IR и циклическую вольтамперометрию проводили по методам Kareru et al. [8] и Arulpriya et al. [9]. ИК-спектры записывали, используя Frontier FT-IR/FIR system («Perkin Элмера», США) в виде гранул КБР. Циклическую вольтамперометрию (CV — cyclic voltammetry) проводили на приборе CHI608E model potential state в стандартных трехэлектродных ячейках из стекловидного углерода с платиновой проволокой и электрода Ag/AgCl при комнатной температуре.

Забор крови человека. Забор крови у здоровых взрослых волонтеров проводили с использованием антикоагулянта, кислой цитратной декстрозы (ACD – Acid Citrate Dextrose; 85 мМ цитрата натрия, 71 мМ лимонной кислоты и 111 мМ декстрозы) в соотношении 6/1 = = кровь/ACD (v/v), после чего центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 37 °C. В результате была получена обогащенная тромбоцитами плазма (супернатант) и осадок, содержащий эритроциты. Осажденные эритроциты промывали 2-3 раза 10 мМ фосатным солевым буфером (PBS – Phosphate Buffer Saline, pH 7,4). Далее получали 2%-ный гематокрит на основе осажденных эритроцитов с добавлением 1 мМ глюкозы в 10 мМ PBS, и использовали его для дальнейшего анализа.

Определение уровня индуцированного ААРН метгемоглобина (MetHb) и активности MetHb-peдуктазы. Образование MetHb в эритроцитах определяли с помощью метода Benesch et al. [10] с небольшими изменениями. Вкратце, по 1 мл эритроцитов (2%-ный гематокрит) помещали в пробирки, независимо обрабатывали различными концентрациями ААРН (0-500 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. После завершения инкубации клетки лизировали в PBS, содержащем 1%-ный Triton X-100 (1/1, v/v) и измеряли поглощение при 630 нм. В качестве положительного контроля эритроциты обрабатывали 20 мМ NaNO<sub>2</sub> (это означало, что образуется 100% МеtНb). Для определения защитного эффекта к предварительно обработанным ААРН (500 мкМ) эритроцитам добавляли различные концентрации экстракта TSCEE (0-200 мкг/мл).

Активность MethHb-редуктазы определяли по методу Sharma et al. [11]. Вкратце, к исходным AAPH (500 мкМ) и предварительно обработанным AAPH (500 мкМ) гемолизатам добавляли различные концентрации TSCEE (0–200 мкг/мл) вместе с НАДН и 2,6 дихлорфенолиндофенолом в качестве акцептора электронов, после чего измеряли поглощение образцов при 600 нм. Активность MethHb-редуктазы рассчитывали по скорости снижения поглощения.

Определение уровня активных форм кислорода (АФК), внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и экстернализации фосфатидилсерина (ФС). Ключевые параметры эриптоза, такие как повышение содержания **АФК**, повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и экстернализация фосфатидилсерина, оценивали с помощью метода Driver et al. [12] с некоторыми незначительными изменениями. Для индукции эриптоза использовали ААРН (1 мМ), а для исследования ингибирования эритроциты (2%-ный гематокрит) предварительно инкубировали с ААРН (1 мМ) и затем обрабатывали различными концентрациями экстракта TSCEE (0-200 мкг/мл). Конечный объем доводили до 200 мкл раствором Рингера, содержащим 125 мМ NaCl, 5 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозы (рН 7,4) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Далее в реакционную смесь добавляли флуоресцентные красители, такие как DCF-DA (10 мкМ), Fura-2AM (2 мкМ) и аннексин V-FITC (5 мкМ), и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин, чтобы определить уровни AФK, внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и степень экстернализации ФС соответственно. Полученную флуоресценцию измеряли с помощью считывателя для микропланшет Varioskan multimode plate reader («Thermo Scientifics», США) при возбуждении реакционной смеси при 488 нм с последующей эмиссией при 530 нм для определения АФК. Для определения внутриклеточной концентрации ионов Са<sup>2+</sup> возбуждение клеток проводили при 340 и 380 нм при постоянной длине волны эмиссии 500 нм. Экстернализацию ФС проводили при длине волны возбуждения 496 нм и длине волны эмиссии 530 нм.

Определение жизнеспособности эритроцитов. Анализ жизнеспособности эритроцитов проводили по методу NaveenKumar et al. [13]. Сначала эритроциты (2%-ный гематокрит) независимо обрабатывали или ААРН (1 мМ) или ТЅСЕЕ (200 мкг/мл). При определении ингибирующей роли клетки обрабатывали ААРН (1 мМ) в присутствии возрастающих концентраций ТЅСЕЕ (0—200 мкг/мл) и инкубировали в течение 8 ч при 37 °С, затем их окрашивали кальцеином АМ (10 мкМ) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Клетки дополнительно промывали и измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 488 нм, а эмиссию регистрировали при 585 нм.

Определение перекисного окисления липидов (LPO — lipid peroxidation) и содержания карбонильных групп в белках (PCC — protein carbonyl content). Перекисное окисление липидов оценивали с помощью метода Ohakawa et al. [14]. В сухие пробирки для определения размещали ~1,0—2,0 мг белка лизата эритроцитов, обрабо-

танных агонистом AAPH (1 мМ) и TSCEE (0-200 мкг/мл). Затем в каждую пробирку добавляли ~1,5 мл 20%-ной уксусной кислоты (v/v) (рН 3,5), 0,2 мл 8%-го (w/v) SDS и 1,5 мл 0,8%-ной (w/v) тиобарбитуровой кислоты. Реакционную смесь нагревали при 45—60 °C в течение 45 мин, затем центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. Образующиеся аддукты экстрагировали 1-бутанолом (3 мл). Образующийся продукт TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substance) регистрировали при 532 нм и рассчитывали его количество, используя в качестве стандарта TMP (1,1,3,3)-тетраметоксипропан).

Содержание карбонильных групп в белках измеряли с помощью динитрофенилгидразина (DNPH) в соответствии с методом, описанным Levine et al. [15]. К 1 мг/мл белка лизата эритроцитов, обработанных агонистом ААРН (1 мМ) и TSCEE (0-200 мкг/мл), добавляли 5 мкл 10 мMDNPH в 2 N HCl и инкубировали в течение 1 ч при периодическом встряхивании при комнатной температуре. Соответствующие контрольные образцы приготавливали путем добавления только 2N HCl. После завершения инкубации реакционную смесь осаждали с помощью 20%-ной ТХУ и центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин. Полученный осадок дважды промывали ацетоном, центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин и растворяли в 1 мл 20 мМ Tris-HCl буфере (рН 7,4), содержащем 0,14 M NaCl и 2% SDS. Поглощение супернатанта регистрировали при 360 нм. Разницу в значении поглощения определяли и выражали в мкм карбонильных групп/мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции  $22 \text{ мM}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Определение содержания GSH и GSSG. Чтобы выяснить редокс-статус эритроцитов, определяли vpoвни GSH и GSSG, используя метод Sundaram et al. [16]. Вкратце, чтобы оценить уровень GSH, к эритроцитам (2%-ный гематокрит), предварительно обработанным агонистом AAPH (1 мМ) и ингибиторами TSCEE (0-200 мкг/мл), добавляли *о*-фталевый альдегид (1 мг/мл) при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее чтобы определить соотношение GSH/GSSG, до добавления о-фталевого альдегида образцы обрабатывали N-этилмалеимидом (10 мкМ). Итоговую флуоресценцию измеряли при 430 нм после возбуждения образцов при 365 нм. Концентрацию GSH и GSSG определяли с использованием стандартных кривых.

Определение активности ферментов, участвующих в поддержании редокс-гомеостаза. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Определение активности СОД и КАТ в лизатах эритроцитов проводили с использованием метода, описанного Sundaram et

аl. [7]. Вкратце, 2%-ный гематокрит в PBS обрабатывали как контроль, а 1 мМ ААРН – как агонист соответственно. Для исследования ингибирующего влияния эритроциты, обработанные ААРН, инкубировали с TSCEE (0-200 мкг) в течение 2 ч. После завершения инкубации эритроциты лизировали в дистиллированной воде и использовали для определения активности ферментов, таких как СОД и КАТ. Для определения активности СОД 0,1 мл лизата эритроцитов (0,05 мг белка) добавляли в реакционную смесь (1 мл), состоящую из фосфатного буфера (16 мМ, рН 7,8), смеси ТЕМЕД/ЭДТА (8 мМ/ 0.08 мM) и 0.15% (w/v) кверцетина. Снижение величины поглощения регистрировали в течение 1 мин при 406 нм. За единицу принимали количество белка, которое ингибирует процесс автоокисления кверцетина на 50%. Для определения активности КАТ в лизатах эритроцитов проводили измерение скорости гидролиза Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> при 240 нм. Образцы эритроцитов (0,05 мг белка) добавляли в реакционную смесь (1мл), содержащую натрий-фосфатный буфер (100 мМ, pH 7,4) и  $H_2O_2$  (8,8 мМ). Регистрировали снижение поглощения при 240 нм в течение 3 мин и активность фермента выражали в виде количества мМ разложившейся  $H_2O_2$ /мин/мг белка.

Определение активности глутатионредуктазы (GRdx), глутатионпероксидазы (GPx) и глутатион-S-трансферазы (GST). Активность GRdx в лизатах эритроцитов определяли по методу, описанному Sundaram et al. [7]. Кратко, к 1 мл 100 мМ фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 2 мМ ЭДТА, 20 мМ GSSG и 2 мМ НАДФН (в 0,1%-ном NaHCO<sub>3</sub>) добавляли 0,1 мл лизата эритроцитов (0,05 мг белка). Снижение величины поглощения при 340 нм регистрировали в течение 3 мин.

Активность GPx измеряли с помощью метода с сопряженными ферментами, как это было описано Tung et al. [17]. В реакционную смесь (1 мл), содержащую 770 мкл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,0), 100 мкл 10 мМ GSH, 100 мкл 2 мМ НАДФН, 10 мкл 1,125 М азида натрия и 10 мкл 100 U/мл GPx, добавляли  $\sim$ 10 мкл лизата эритроцитов. После уравновешивания смеси в течение 10 мин реакцию начинали, добавляя в реакционную смесь 50 мкл 5 мМ  $\rm H_2O_2$ , и измеряли окисление НАДФН в течение 3 мин при 340 нм. Активность GPx рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции для НАДФН при 340 нм, равный 6,22  $\rm M^{-1}cm^{-1}$ .

Активность GST измеряли в соответствии с методом Guthenberg et al. [18]. В реакционную смесь (1 мл), содержащую 900 мкл 100 мМ PBS (рН 6,5,), 1 мМ ЭДТА, 50 мкл 20 мМ GSH и 50 мкл CDNB (20 мМ раствор в этаноле), аго-

нист (ААРН, 1 мМ) и ингибитор (TSCEE, 0—200 мкг/мл), добавляли предварительно обработанные эритроциты (2%-ный гематокрит). Смесь инкубировали течение 3 ч, после чего регистрировали увеличение поглощения при 340 нм в течение 3 мин. За едицину активности глутатионредуктазы, глутатиопероксидазы и глутатион-Sтрансферазы принимали количество фермента, необходимое для получения 1,0 мкмоль соответствующего продукта или потребление 1,0 мкмоль соответствующего субстрата за 1 мин.

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH). Активность G6PDH определяли по увеличению величины поглощения при 340 нм в течение 3 мин благодаря НАДФ-зависимому превращению глюкозо-6-фосфата [16]. Вкратце, промытые эритроциты (2%-ный гематокрит в PBS) обрабатывали агонистом AAPH (1 мМ). При исследовании ингибирующего эффекта обработанные ААРН эритроциты инкубировали с TSCEE (0-200 мкг) в течение 3 ч при 37 °C. После завершения инкубации эритроциты суспендировали и лизировали в 1 мМ PBS буфере. Лизаты использовали для определения активности G6PDH в реакционной смеси (1 мл) 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), содержащей 3,8 мМ НАДФ, 3,3 мМ глюкозо-6-фосфата и 6,3 мМ MgCl<sub>2</sub>. За единицу активности глюкозо-6-фосфатдегирогеназы принимали количество фермента, способное производить 1,0 мкмоль НАДФН в течение 1 мин.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка в образцах определяли по методу Lowry et al. [19], используя в качестве стандарта БСА.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ был выполнен при использовании программы Graph Pad Prism. Все результаты представляют среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка отклонения трех независимых экспериментов.

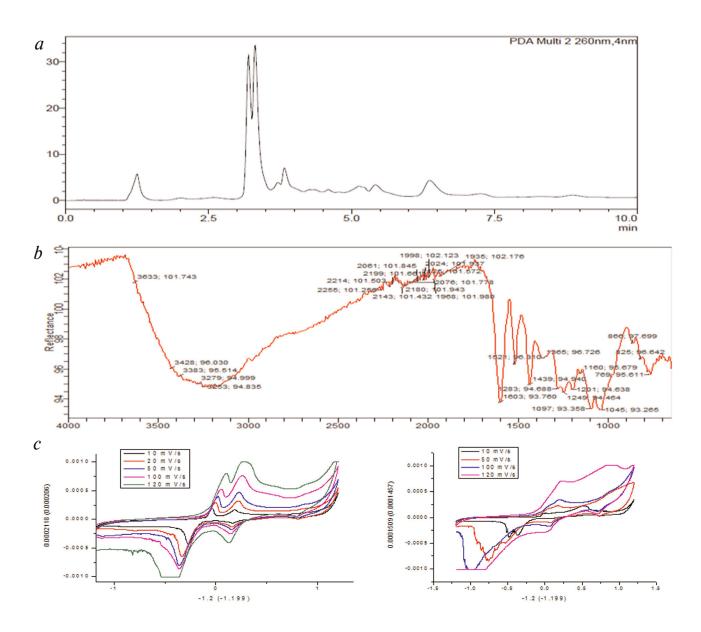
#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экстракт TSCEE содержит большое количество алкалоидов, флавоноидов и полифенолов. Для определения фитохимических составляющих в экстракте TSCEE, образцы подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке C18 с фотодиодным регистратором (RP-HPLC-Photo Diode Array detector). Мониторинг хроматографического разделения проводили в диапазоне длин волн 200—800 нм в течение 1 ч. Полученные хроматограммы свидетельствуют о том, что фитохимическими веществами, присутствующими в экстракте TSCEE, яв-

ляются алкалоиды, флавоноиды и полифенолы (рис. 1, a). Далее спектры FTIR экстракта TSCEE показали присутствие полосы поглощения при 3446 и 3429 см $^{-1}$ , предполагающие растяжение связи О-H. Кроме того, в экстракте TSCEE была обнаружена арильная полоса при 590 см $^{-1}$ , а алкильные полосы появлялись при 507 и 521 см $^{-1}$ . Это укрепляет предположение о присутствии гидроксильных, арильных и алкильных групп в экстракте TSCEE, что свидетельствует о наличии активных биохимических соединений (рис. 1, b).

Антиоксидантная активность **TSCEE.** Для определения антиоксидантного потенциала экстракта TSCEE скорость окислительно-восстановительного сканирования измеряли, используя различные системы растворителей  $K_4[Fe\ (CN)_6] + K_3[Fe(CN)_6] + KCL$ (5мМ) в диапазоне скорости сканирования  $10-120 \text{ мBc}^{-1}$  и КОН (0,3 мМ). Установлено, что диапазон потенциалов окислительно-восстановительных пиков для электрода сравнения составляет от -1,2 до +1,2 В относительно Ag/AgCl (0,1 мМ КСL). Был приготовлен электрод на основе углеродной пасты (СРЕ) путем измельчения порошка графита (70%) и силиконового масла (30%) при использовании небольшого пестика и ступки при ручном перемешивании в течение ~30 мин, что позволило получить гомогенный чистый СРЕ. Он действует как рабочий электрод, платиновая проволока выступает в качестве противоположного электрода и Ag/AgCl — в качестве электрода сравнения. Для этого экстракта нами были получены два пика окисления (Epc = -0.030 и 0.175) и два пика восстановления (Epa = -0.270 и 0.164). Анодный пиковый ток сдвигает Ера в анодном направлении в присутствии TSCEE. Это указывало на то, что фитоконституенты TSCEE адсорбировались на поверхности электрода. Наши наблюдения позволяют предположить, что процесс был диффузионно контролируемым. Кроме того, было обнаружено, что Ера смещается в анодном направлении с увеличением скорости развертки, что указывает на квазиобратимый характер электродной реакции. Было также отмечено, что анодный пиковый потенциал (Ера) и полупиковый потенциал (Ерс) были смещены в сторону более положительных значений, это свидетельствует о том, что экстракт тушит свободные радикалы кислорода. Рис. 1, с представляет собой электрохимические циклические вольтамперограммы кривых экстракта TSCEE.

Экстракт TSCEE понижает индуцированное AAPH образование AФК, уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, смягчает экстернализацию ФС и понижает уровень гибели эритроцитов. Было изучено



**Рис. 1.** Анализ с использованием HPLC и антиоксидантная активность экстракта TSCEE. На рис. 1 представлены результаты проведенного анализа TSCEE с использованием RP-HPLC и FTIR и циклической вольтмаперометрии. a- TSCEE анализировали с помощью метода RP-HPLC с использованием колонки  $C_{18}$  (150 × 4,60 мм; размер частиц 5 мкм). Колонка, предварительно уравновешенная 10%-м ацетонитрилом в воде для HPLC. Образец элюировали с использованием линейного градиента (9 : 1 v/v) растворителя A (вода для HPLC) и растворителя B (ацетонитрил) со скоростью потока 1 мл/мин в диапазоне 200-800 нм. Белок элюировали при скорости потока 1 мл/мин при мониторинге в диапазоне 200-800 нм. b- Спектры FTIR (Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) экстракта TSCEE показывают вероятные функциональные группы в TSCEE. c- Результаты цикловольтамперометрического анализа, объясняющие редокс-потенциал экстракта оболочки семян тамаринда.

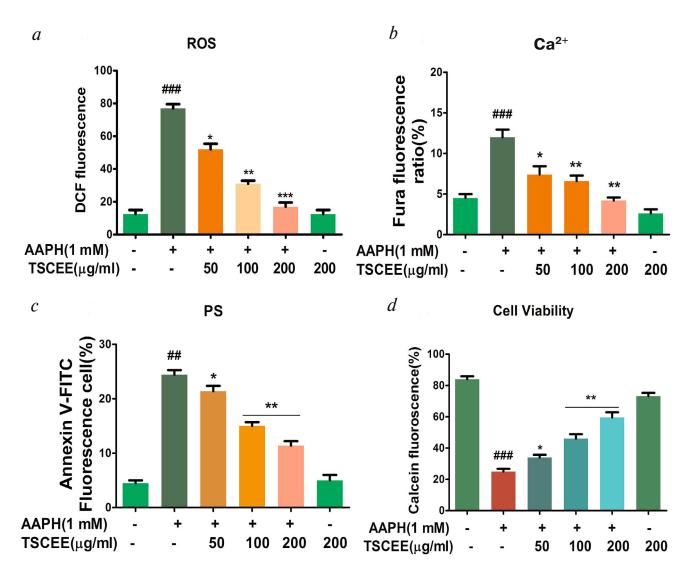
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

влияние экстракта TSCEE на запускаемую AAPH генерацию AФК с помощью маркировки эритроцитов флуорофором DCF-DA. Значительное повышение уровня АФК наблюдали при инкубации эритроцитов только с AAPH, в то время как не было никаких изменений при инкубации эритроцитов только с экстрактом

TSCEE. Кроме того, экстракт TSCEE значительно понижал уровень генерации  $A\Phi K$ , вызванной AAPH, это явление зависело от дозы, и полное ингибирование наблюдали при концентрации 200 мкг (рис. 2, a). На рис. 2, b показано влияние TSCEE на индуцированное  $AA\Pi\Gamma$  повышение уровня  $Ca^{2+}$  в эритроцитах. Для измерения уров-

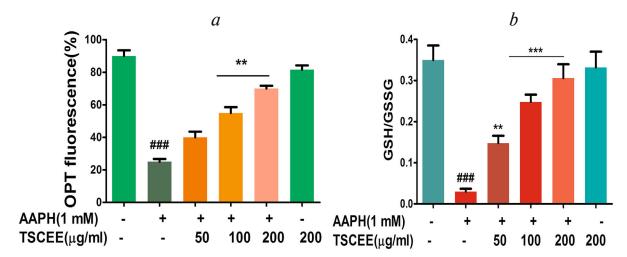
ня содержания внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> использовали флуоресцирующий индикатор их присутствия. Обработка отмытых эритроцитов с использованием AAPH вызывала повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Экстракт TSCEE повышал уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> в результате дозозависимой индукции AAPH. Было обнаружено, что TSCEE осуществляет значительную защиту при концентрации

200 мкг. Устойчивое повышение внутриклеточного уровня  $\mathrm{Ca}^{2^+}$  является ключевым событием в инициировании скремблирования мембран и экстернализации  $\Phi\mathrm{C}$ , которое можно идентифицировать с помощью окрашивания аннексином V. Как видно на рис. 2, c AAPH усиливал связывание аннексина V, а экстракт TSCEE ингибировал связывание аннексина в зависимости от дозы, и значительное ингибирование на-



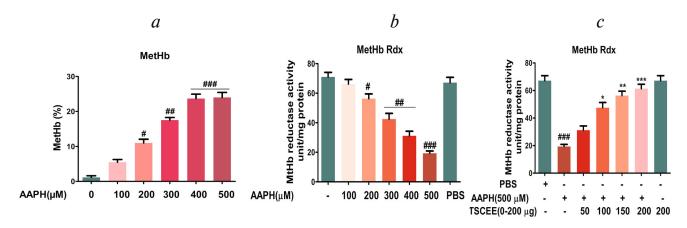
**Рис. 2.** Влияние TSCEE на AAPH-индуцированное образование AФK, внутриклеточный уровень ионов  $Ca^{2+}$ , ФС и процесс гибели эритроцитов. Влияние TSCEE на AAPH-индуцированное образование AФK и репрезентативная диаграмма, на которой представлены средние значения изменений интенсивности флуоресценции DCF (*a*). *b* — Влияние TSCEE на AAPH-индуцированные изменения уровня ионов  $Ca^{2+}$  внутри клеток. *c* — Влияние TSCEE на AAPH-индуцированную экстернализацию ФС эритроцитов, и их репрезентативную гистограмму, показывающую медианные изменения интенсивности флуоресценции FITC-конъюгированного аннексина-V. *d* — Определение выживаемости клеток при использовании регистрации флуоресценции кальцеина. Промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в растворе Рингера, дополненной AAPH в присутствии или в отсутствие TSCEE. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM (*n* = 5), выраженных в виде процентов, на которые возросла флуоресценция DCF, Fura-2/AM и аннексина в сравнении с контролем. \*\* *p* < 0,01, \*\*\*\**p* < 0,001 достоверно по сравнению с ААPH.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



**Рис. 3.** Влияние TSCEE на AAPH-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах и оценка маркером стресса. Соотношение GSH (a) и GSH/GSSG (b) в эритроцитах. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной AAPH (1 MM) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Для определения соотношения GSH и GSH/GSSG были использованы лизаты отмытых эритроцитов, что достоверно отличалось от контроля. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n=5); ### p < 0.001 достоверно по сравнению с контролем; \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



**Рис. 4.** Влияние ААРН на образование MetHb определяли по активности MetHb-редуктазы. a — ААРН дозозависимо индуцировал образование MetHb при концентрации 100, 200, 300, 400, 500 мкМ в течение 24 ч при 37 °C. b — активность MetHb-редуктазы в лизате эритроцитов, обработанном ААРН (0-500 мкМ). c — Ингибирование ААРН-индуцированного образования MetHb с помощью преинкубации с TSCEE. Все данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n = 5);  $^*p$  < 0,05,  $^{**}p$  < 0,01,  $^{***}p$  < 0,001 по сравнению только с ААРН.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

блюдали при концентрации 200 мкг. Для определения эффективности защиты экстракта TSCEE для эритроцитов, обработанных ААРН, проводили анализ жизнеспособности клеток с использованием кальцеинового красителя (рис. 2, d). Примечательно, что TSCEE показал значительную защитную эффективность на поврежденных клетках эри-троцитов, поскольку он способствовал сохранению нормальной

морфологии клеток в концен-трации 200 мкг, которая была сопоставима только с положительными контрольными эри-троцитами. Поэтому можно предположить, что TSCEE защищает эритроциты от эриптоза, индуцированного окислительным стрессом.

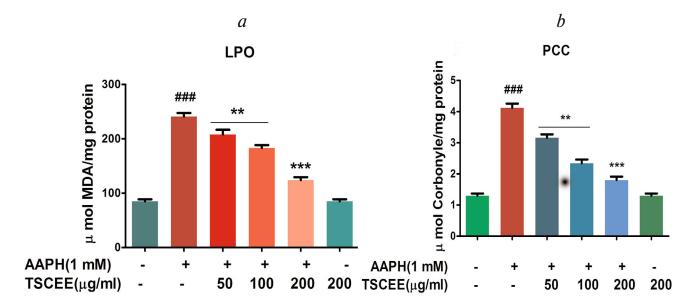
**TSCEE восстанавливает уровень GSH в эриптотических эритроцитах.** GSH играет жизненно важную роль в смягчении окислительного

стресса, так как он участвует в детоксикации через конъюгацию. Снижение уровня GSH оказывает негативное влияние на клеточную и молекулярную функцию. Поэтому нами было изучено влияние экстракта TSCEE на уровень GSH в эритроцитах, обработанных ААРН. В нормальных эритроцитах был выявлен обычный уровень GSH. С другой стороны, в эритроцитах, обработанных ААРН, уровень GSH был понижен в сравнении с контролем. Следует подчеркнуть, что 200 мкг экстракта TSCEE способствовали восстановлению нормального уровня GSH в эритроцитах, обработанных ААРН (рис. 3, а). Кроме того, обработка клеток экстрактом TSCEE эффективно восстанавливала соотношение GSH/GSSG, нарушенное применением AAPH (рис. 3, b).

**TSCEE** восстанавливает уровень редуктазы MetHb в эриптотических эритроцитах. В обработанных ААРН лизатах РБК наблюдался повышенный процент образования MetHb по сравнению с необработанным лизатом эритроцитов (рис. 4, *a*). Исследовали активность редуктазы MetHb, ответственной за реверсию MetHb в гемоглобин. В поврежденных эритроцитах уровень редуктазы MetHb был резко снижен по сравнению с лизатом эритроцитов, обработанным PBS (рис. 4, *b*). Интересно, что TSCEE нормализовал уровень редуктазы MetHb в лизате

эритроцитов, обработанном ААРН, дозозависимым образом по сравнению с необработанным лизатом эритроцитов (рис. 4, c).

TSCEE уменьшает вызванные действием ААРН перекисное окисление липидов и карбонилирование белков. Перекисное окисление липидов — ключевое событие, которое демонстрирует последствия окислительного стресса. На рис. 5, а представлены результаты изучения влияния экстракта TSCEE на индуцированное ААРН перекисное окисление липидов. Эритроциты, которые подверглись воздействию ААРН, демонстрировали значительное повышение уровня перекисного окисления липидов, что можно видеть по существенному увеличению содержания малонового альдегида (МДА). Вызывает интерес тот факт, что TSCEE понижал уровень МДА в дозозависимом режиме, и полное ингибирование наступало при концентрации 200 мкг/мл. Далее исследовали защитное действие TSCEE на степень окисления белков в эритроцитах человека. Экспериментальные результаты показали значительное повышение уровня карбонильных групп в эритроцитах обработанных ААРН по сравнению с контролем. Более того, экстракт TSCEE в концентрации 200 мкг/мл вызывал значительное снижение уровня карбонильных групп в эритроцитах, подвергшихся воздействию AAPH (рис. 5, b).

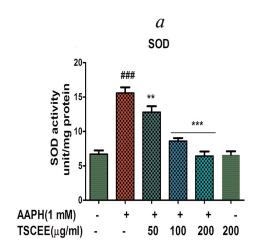


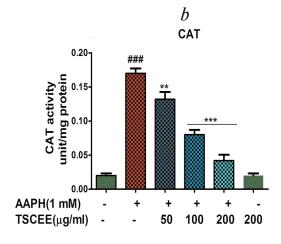
**Рис. 5.** Влияние TSCEE на AAPH-индуцированный окислительный стресс в эитроцитах и оценка маркеров стресса. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной AAPH (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Влияние TSCEE на индуцированное AAPH (*a*) перекисное окисление липидов (LPO), b — содержание карбонильных групп в белках (PCC), LPO и PCC определяли с использованием образцов мембран эритроцитов (1 мг/мл). Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM (n = 5). \*\*#\* p < 0,001 достоверно по сравнению с контролем; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 достоверно по сравнению с ААРН. С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

TSCEE модулирует AAPH-индуцированное окислительное повреждение и восстанавливает активность ферментов, участвующих в окислительно-восстановительном гомеостазе. Постоянный окислительный стресс является первичным фактором, который истощает антиоксидантную систему клеток. Эндогенные антиоксидантные ферменты, такие как СОД и КАТ, играют ключевую роль в восстановлении исходного редокссостояния клеток. Поэтому в настоящей работе было оценено защитное действие экстракта TSCEE на уровни антиоксидантных ферментов. Значительное повышение активности антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ) было отмечено в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мM) (рис. 6, *a* и *b*), и резкое снижение активности СОД и КАТ наблюдали в эритроцитах, обработанных TSCEE (0-200 мкг). В дополнение к изменениям активности антиоксидантных ферментов еще одним ключевым событием в борьбе с окислительным стрессом является повышение уровня эндогенного GSH. Поэтому в настоящей работе были определены уровни ферментов, которые восстанавливают исходный уровень GSH, включая GST, GR, GPx и G6PDH, в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE (рис. 7, a и b). Было показано, что в эритроцитах, обработанных ААРН (1 мМ), происходит значительное увеличение активности всех антиоксидантых ферментов. Более того, наблюдали значительное понижение активности G6PDH и GST, а обработка клеток экстрактом TSCEE (200 мкг) приводила к существенному восстановлению активности этих ферментов. Кроме того, активность ферментов, задействованных в кругообороте глутатиона, таких как GRdx (рис. 7, c) и GPx (рис. 7, d), снижалась после обработки клеток AAPH. В то же время обработка эритроцитов экстрактом TSCEE (200 мкг) приводила к существенному восстановлению активности GRdx и GPx в эритроцитах, обработанных AAPH.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

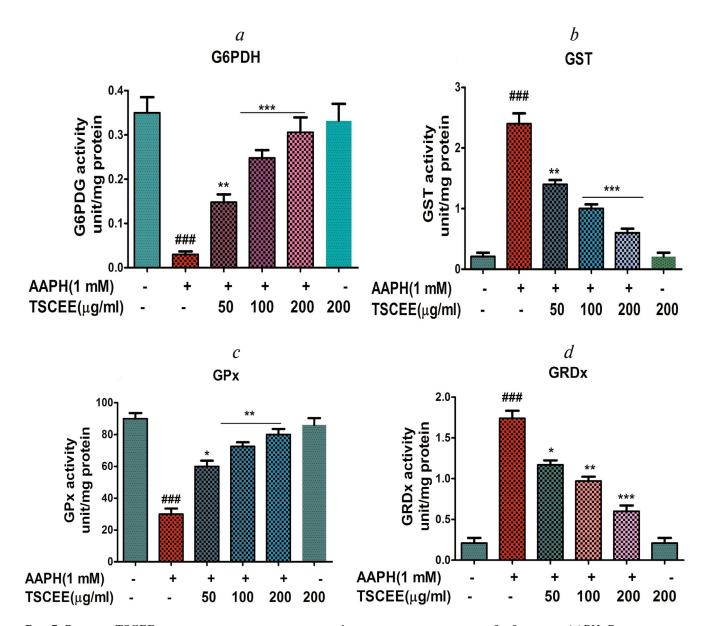
Эритроциты являются основными клеточными компонентами, которые в кровотоке часто подвергаются воздействию различных химических соединений способных быстро разрушить мембрану эритроцитов и воздействовать на их нормальное функционирование. Эритроциты являются основными несущими кислород клетками, поэтому они наиболее склонны к окислительному повреждению, которое может в дальнейшем закончиться гемолизом или вызвать самоубийственную смерть, называемую эриптозом [20]. Подобно апоптозу, эриптоз характеризуется увеличением внутриклеточного Са<sup>2+</sup>, сморщиванием клеток, обесцвечиванием мембран и экспонированием фосфатидилсерина на клеточной мембране. Сообщалось, что окислительный стресс вызывает эриптоз путем активации чувствительного к ионам Са<sup>2+</sup> проницаемого неизбирательного катионного канала. Проникновение внутрь клетки значительных





**Рис. 6.** TSCEE модулирует AAPH-индуцированные окислительные повреждения и восстанавливает активность ферментов, участвующих в окислительно-восстановительном гомеостазе. Активность супероксиддисмутазы (a) и каталазы (b) в эритроцитах. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной AAPH (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM (n=5); \*\*\* p < 0.001 достоверно по сравнению с контролем; \*\*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.001 достоверно по сравнению с AAPH.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/



**Рис. 7.** Влияние TSCEE на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах, обработанных ААРН. Вкратце, промытые эритроциты инкубировали с конечной реакционной смесью 2%-го гематокрита в PBS, дополненной ААРН (1 мМ) в присутствии или в отсутствие TSCEE (a). b — Активность G6PDH и GST. c — Активность GPx. d — Активность GRdx. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  SEM (n = 5); ### p < 0,001 достоверно по сравнению с контролем; \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 достоверно по сравнению с ААРН.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

количеств ионов  $Ca^{2+}$  может привести к возникновению последующих событий эриптоза, например, сморщивание клеток путем активации каналов, чувствительных к ионам  $Ca^{2+}$  и  $K^+$ , с последующей гиперполяризацией мембраны. Выход ионов  $Ca^{2+}$  вызывает сморщивание клеток из-за потери KCl вместе с водой в результате осмоса. Повышение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  также ассоциируется со скремблингом мембран и  $\Phi C$ , основными признаками эриптоза. Кроме

того, окислительный стресс может привести к активации каспаз, тем самым запуская эриптоз [21].

При некоторых случаях окислительного стресса, ассоциированного с патологическими состояниями, такими как рак, диабет, ХБП и др., наблюдается повышенная гибель эритроцитов в результате эриптоза и последующая тяжелая анемия. Кроме того, было показано, что несколько противоопухолевых препаратов так-

же индуцируют эриптоз [3, 21]. Таким образом, регулирование окислительного стресса может стать ключом к борьбе с анемией при этих клинических заболеваниях. Было показано, что ряд антиоксидантных молекул растительного происхождения обеспечивают защиту от индуцированного окислительным стрессом эриптоза [22]. Лекарственное использование различных частей тамариндового дерева хорошо документировано в традиционной медицине [23]. В настоящем исследовании оценивали защитную эффективность TSCEE против индуцированного окислительным стрессом эриптоза. Хроматограмма экстракта TSCEE, полученная при RP-HPLC анализе, показала присутствие различные биологически активные компоненты таких как флавоноиды, каротиноиды и полифенолы. Более того, данные анализа FTIR указывают на присутствие в растительных компонентах экстракта TSCEE карбонильных, гидроксильных и кетоновых групп. Гидроксильные группы могут тушить образовавшиеся во время окислительного стресса свободные радикалы, и это обстоятельство может быть отнесено на счет эффективности защиты экстракта TSCEE. Более того, с помощью циклических вольтамперометрических исследований также была подтверждена антиоксидантная активность экстракта TSCEE.

ААРН запускает окислительный стресс, индуцирующий образование метгемоглобина с пониженной редуктазной активностью. Превращение гемоглобина в MetHb может отменить способности связывать молекулярный кислород, превращая его в нефункциональный белок. Это может привести к возникновению состояния, называемого метгемоглобинемией [24–26]. Метгемоглобинредуктаза является ключевым ферментом, который превращает МеtHb в гемоглобин и восстанавливает его функциональную активность. Возможно, благодаря снижению уровня окислительного стресса и восстановлению активности метгемоглобинредуктазы TSCEE в значительной степени снижает образование MetHb. На основе предыдущих исследований можно предполагать, что окислительный стресс является главным фактором, индуцирующим образования MetHb. Любые такие изменения делают эритроциты более восприимчивыми к старению и гибели клеток. Поврежденные эритроциты удаляются из кровотока в результате особого процесса гибели клеток, который называется эриптозом. Повышение концентрации АФК и последующее проникновение ионов Ca<sup>2+</sup> в эритроциты, в свою очередь, может активировать каспазы и способствовать транслокации ФС на поверхность эритроцитов, тем самым подготавливая их к эриптотической гибели клеток [21]. Таким образом, способность экстракта **TSCEE** противостоять эриптозу может быть связана с его врожденным антиоксидантным потенциалом, благодаря которому он может тушить АФК и таким образом снижать уровень окислительного стресса. Более того, TSCEE в значительной степени понижал уровень перекисей липидов и содержание карбонильных групп в белках, которые являются маркерами окислительного стресса. Перекисное окисление липидов является одним из основных индикаторов окислительных повреждений, вызванных АФК. Эритроциты богаты ненасыщенными липидами, и их мембраны более склонны к окислительному повреждению. Известно, что большое количество перекисей липидов вызывает нарушение нормального функционирования клетки, снижение текучести мембран, инактивацию мембраносвязанных рецепторов и ферментов и повышение неспецифической проницаемости ионов, что в итоге приводит к повреждению клетки [27–29]. Кроме того, карбонилирование белков может вызвать изменения структуры и функций клетки [30]. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных групп в белках также в значительной степени снижалось в результате действия TSCEE, это свидетельствовало о том, что TSCEE может ингибировать вызванные воздействием ААРН нарушения в эритроцитах.

Выживание эритроцитов абсолютно зависит от их способности поддерживать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз. Как ферментативные, так и неферментативные механизмы работают совместно для борьбы с окислительным стрессом. GSH – основной эндогенный антиоксидант, который помогает клеткам избавляться от повышенных уровней АФК [31, 32]. Было обнаружено, что TSCEE восполняет количество глутатиона в эритроцитах, которые были предварительно обработаны индуктором свободных радикалов, ААРН. Кроме того, экстракт TSCEE также способствовал восстановлению активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД и КАТ. Кроме того, TSCEE восстановил активность ферментов (GST, GR GPx и G6PDH), участвующих в пополнении GSH. В процессе регенерации GSH молекула НАДФН является одним из ключевых факторов, которые образуются в эритроцитах с помощью фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH) в ходе гексозомонофосфатного пути (HMP shunt pathway) [33]. Поэтому защитная эффективность TSCEE может быть обусловлена ее способностью восстанавливать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз.

В заключение, можно резюмировать, что TSCEE способен эффективно защищать эритроциты от индуцированных ААРН окислительных повреждений и эриптоза. Это может быть связано с наличием активных фитохимических веществ, таких как алкалоиды, флавоноиды и полифенольные соединения. Благодаря способности тушить свободные радикалы терапевтические средства на основе лекарственных растений могут стать эффективным средством в борьбе с окислительным стрессом и возникающим вследствие его эриптозом и противодействовать анемии при различных патологических состояниях.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Правительства Индии, Нью Дели и VGST и Правительства Каранатака.

**Благодарности.** Джайанна выражает благодарность UGC-RGNF, Правительству Индии, Нью

Дели за представленную стажировку. DS благодарит проф. К Кемпарайю, университет Мисора, проф. Гириш К.С., доктора П. Рагхавендра Кумар, Бхагялаксми М., университет Тумкура за их помощь при выполнении данной работы. Авторы также выражают благодарность Маникара М. и Светакумар Б., университет Мисора за их любезную помощь при выполнении работы.

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

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palis, J. (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals, Front. Physiol., 5, 3, doi: 10.3389/fphys.2014. 00003
- Lang, K.S., Lang, P.A., and Bauer, C. (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death, *Cell. Physiol. Biochem.*, 15, 195–202
- 3. Bissinger, R., Modicano, P., Alzoubi, K., Honisch, S., Faggio, C., Abed, M., and Lang, F. (2014) Effect of saponins on erythrocytes, *Int. J. Hematol.*, **100**, 51–59.
- Lang, E., Bissinger, R., Qadri, S.M., and Lang, F. (2017) Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: a potential target in the treatment of tumor-associated anaemia, *Int. J. Cancer*, 141, 1522–1528.
- Lang, F., Lang, K.S., Lang, P.A., Huber, S.M., and Wieder, T. (2006) Mechanisms and significance of eryptosis, *Antioxid. Redox Signal.*, 8, 1183–92.
- Girish, K.S., Paul, M., Thushara, R.M., Hemshekhar, M., Shanmuga, S.M., Rangappa, K.S., and Kemparaju, K. (2013) Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 438, 198–204.
- Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Santhosh, M.S., Paul, M., Sunitha, K., Thushara, R.M., Naveen Kumar, S.K., Devaraja, S., Rangappa, K.S., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2015) Tamarind Seed (*Tamarindus indica*) Extract ameliorates adjuvant-induced arthritis via regulating the mediators of cartilage/bone degeneration, inflammation and oxidative stress, *Sci. Rep.*, 5, 11117.
- Kareru, P.G., Keriko, J.M., Gachanja, A.N., and Kenji, G.M. (2008) Direct detection of triterpenoid saponins in medicinal plants, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 5, 56–60.
- 9. Arulpriya, P., Lalitha, P., and Hemalatha, S. (2010) Cyclic voltametric assessment of the antioxidant activity of petroleum ether extract of *Samanea saman* (Jacq) Merr, *Adv. Appl. Sci. Res.*. 1, 24–35.
- Appl. Sci. Res., 1, 24–35.
  10. Benesch, R.E., Benesch, R., and Yung, S. (1973)
  Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures, Anal. Biochem., 55, 245–248.
- 11. Sharma, R.D., Katkar, G.D., Sundaram, M.S., Paul, M., NaveenKumar, S.K., Swethakumar, B.,

- Hemshekhar, M., Girish, K.S., and Kemparaju, K. (2015) Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin, *J. Pineal Res.*, **59**, 240–254.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R., and Mundy, W.R. (2000) Age related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates, *Neurotoxicol. Teratol.*, 22, 175–181.
- NaveenKumar, S.K., Thushara, R.M., Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Paul, M., Thirunavukkarasu, C., Basappa, Nagaraju, G., Raghavan, S.C., Girish, K.S., Kemparaju, K., and Rangappa, K.S. (2015) Unconjugated bilirubin exerts pro-apoptotic effect on platelets via p38-MAPK activation, *Sci. Rep.*, 5, 15045.
   Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351–358.
- Levine, R.L., Garland, D., and Oliver, C.N. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, 186, 464–478.
- Sundaram, M.S., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Santhosh, M.S., Kumar, S.K., Paul, M., Devaraja, S., Kemparaju, K., Rangappa, K.S., and Girish, K.S. (2014) Tamarind seed extract mitigates the liver oxidative stress in arthritic rats, Food Funct., 5, 587–597.
- 17. Tung, B.T., Hai, N.T., and Thu, D.K. (2017) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 198, 24–32.
- 18. Guthenberg, C., Alin, P., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferase from rat testis, *Methods Enzymol.*, 113, 507–510.
- 19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- 20. Föller, M., Huber, S.M., and Lang, F. (2008) Erythrocyte programmed cell death, *IUBMB Life*, **60**, 661–668.
- 21. Lang, F., Abed, M., Lang, E., and Föller, M. (2014) Oxidative stress and suicidal erythrocyte death, *Antioxid. Redox Signal*, **21**, 138–153.

- Jagadisha, S., Hemshekhara, M., NaveenKumara, S.K., Sharath Kumar, K.S., Sundaram, M.S., Basappa., Girisha, K.S., and Rangappa, K.S. (2017) Novel oxolane derivative DMTD mitigates high glucose induced erythrocytes apoptosis by regulating oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 334,167–179.
- 23. Bhadoriya, S.S., Ganeshpurkar, A., Narwaria, J., Rai, G., and Jain, A.P. (2011) *Tamarindus indica*: extent of explored potential, *Pharmacogn. Rev.*, **5**, 73–71.
- Dong, X., Kiss, L., Petrikovics, I., and Thompson, D.E. (2017) Reaction of dimethyl trisulfide with haemoglobin, *Chem. Res. Toxicol.*, 30, 1661–1663.
- Chem. Res. Toxicol., 30, 1661–1663.
  Ding, Y., Liu, H., Tekwani, B.L., Nanayakkara, N.P.D., Khan, I.A., Walker, L.A., and Doerksen, R.J. (2016) Methemoglobinemia hemotoxicity of some antimalarial 8-aminoquinoline analogues and their hydroxylated derivatives: density functional theory computation of ionization potentials, Chem. Res. Toxicol., 29, 1132–1141.
- Puchulu-Campanella, E., Chu, H., Anstee, D.J., Galan, J.A., Tao, W.A., and Low, P.S. (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane, *J. Biol. Chem.*, 288, 848–858.
- 27. Qadri, S.M., Mahmud, H., Föller, M., and Lang, F. (2009) Inhibition of suicidal erythrocyte death by xanthohumol, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7591–7595.

- 28. Shaik, N., Lupescu, A., and Lang, F. (2013) Inhibition of suicidal erythrocyte death by probucol, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **61**, 120–126.
- Zierle, J., Bissinger, R., and Lang, F. (2016) Inhibition by teriflunomide of erythrocyte cell membrane scrambling following energy depletion, oxidative stress and ionomycin, *Cell. Physiol. Biochem.*, 39, 1877–1890.
   Sebastin Santhosh, M., Hemshekhar, M., Thushara, R.M.,
- Sebastin Santhosh, M., Hemshekhar, M., Thushara, R.M., Devaraja, S., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2013) Vipera russelli venom induced oxidative stress and hematological alterations: amelioration by crocin a dietary colorant, *Cell. Biochem. Funct.*, 31, 41–50.
- 31. Vitak, T.Y., Wasser, S.P., Nevo, E., and Sybirna, N.O. (2017) Enzymatic system of antioxidant protection of erythrocytes in diabetic rats treated with medicinal mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), *Int. J. Med. Mushrooms*, 19, 697–708.
- 32. Jha, R., and Rizvi, S.I. (2011) Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, **155**, 39–42.
- 33. Vishalakshi, G.J., Hemshekhar, M., Kemparaju, K., and Girish, K.S. (2018) Para-tertiary butyl catechol induces eryptosis *in vitro* via oxidative stress and hemoglobin leakage in human erythrocytes, *Toxicol. In Vitro*, **52**, 286–296.

### PROTECTIVE EFFICACY OF TAMARIND SEED COAT ETHANOLIC EXTRACT ON OXIDATIVE STRESS INDUCED ERYPTOSIS

J. Kengaiah<sup>1</sup>, S. K. M. Nandish<sup>1</sup>, Ch. Ramachandraiah<sup>1</sup>, Chandramma<sup>1</sup>, A. Shivaiah<sup>1</sup>, G. J. Vishalakshi<sup>2</sup>, M. Paul<sup>2</sup>, S. M. Santhosh<sup>3</sup>, R. L. Shankar<sup>4</sup>, and D. Sannaningaiah<sup>1\*</sup>

Received April 1, 2019 Revised October 4, 2019 Accepted October 17, 2019

Suicidal erythrocyte death or eryptosis is the key event in eliciting anaemia in multitude of pathological conditions including diabetes, chronic kidney diseases, cancer, sepsis, etc. Oxidative stress is an important trigger in accelerating erythrocyte loss by eryptosis and has been shown to be the underlying mechanism for anaemic conditions in above said pathologies. Thus, the identification of antioxidant and anti-eryptotic agents for management of the oxidative stress-related ailments is in increasing demand today. The current work demonstrates antioxidant and anti-eryptotic assets of tamarind seed coat ethanol extract (TSCEE) against AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride)-induced oxidative stress and eryptosis. The presence of probable secondary metabolites in the TSCEE extract was investigated by RP-HPLC column chromatography. The active groups present in the TSCEE were studied using the Fourier-transform infrared spectroscopy. Cyclic voltammetric studies confirmed the antioxidant potential of TSCEE. Further, the red blood cells protection property of TSCEE was confirmed by assessing various eryptotic markers such as reactive oxygen species, cellular calcium level, and phosphatidyl serine exposure. In addition, TSCEE reduced lipid peroxidation and protein carbonyl content, restored cellular glutathione level, antioxidant enzymes and enzymes involved in glutathione replenishment. Thus, TSCEE may be a promising therapeutic agent for curing oxidative stress-induced eryptosis and subsequent anaemia in various pathologies.

Keywords: tamarind seed coat ethanol extract (TSCEE), reactive oxygen species (ROS), eryptosis, GSH/GSSG, G6PDH, antioxidant, AAPH

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Department of Studies in Biochemistry, University of Mysore, Manasagangothry, 570006 Mysore, India

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Department of Sericulture, Yuvaraja's College, University of Mysore, 570006 Mysore, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com